



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**INTERACCIONES DEL VIRUS DE LA GRIPE CON
LA CÉLULA HOSPEDADORA: IDENTIFICACIÓN DE
DIANAS CELULARES CON POTENCIAL PARA LA
INHIBICIÓN DEL VIRUS**

TESIS DOCTORAL
SARA LANDERAS BUENO
Julio, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**INTERACCIONES DEL VIRUS DE LA GRIPE CON
LA CÉLULA HOSPEDADORA: IDENTIFICACIÓN DE
DIANAS CELULARES CON POTENCIAL PARA LA
INHIBICIÓN DEL VIRUS**

**Memoria presentada por Sara Landeras Bueno
para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, Julio 2014**



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), bajo la dirección del Dr. Juan Ortín Montón.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE	13
ABREVIATURAS	23
SUMMARY	27
INTRODUCCIÓN	31

El virus de la gripe

1. Historia y epidemiología	31
2. Clasificación taxonómica	32
3. La partícula viral	33
3.1 Proteínas virales	33
3.2 Organización genómica y RNAs virales en la célula infectada	33
3.2.1 vRNAs o RNAs genómicos	35
3.2.2 cRNAs o RNAs complementarios	36
3.2.3 mRNAs o RNAs mensajeros	37
3.3 La RNP viral	38
3.3.1 La polimerasa viral	
3.3.1.1 La subunidad PB1	39
3.3.1.2 La subunidad PB2	39
3.3.1.3 La subunidad PA	39
3.3.2 La nucleoproteína	40
3.3.3 Estructura de la RNP	41
4. El ciclo de infección	41
4.1 Adsorción y entrada de las partículas virales	41
4.2 Transcripción primaria	41
4.2.1 Iniciación y elongación de los mRNAs virales	41
4.2.2 <i>Splicing</i> de mRNAs virales	42
4.2.3 Poliadenilación de los mRNAs virales	42
4.3 Traducción de proteínas virales	42
4.4 La replicación viral	43
4.5 Transcripción secundaria	43
4.6 Ensamblaje de los viriones y liberación	43

Factores celulares implicados en la replicación del RNA viral y en la expresión génica

1. Proteínas implicadas en el transporte nuclear de proteínas virales	45
2. Proteínas implicadas en la compartimentalización de la síntesis de RNA	46
3. Proteínas celulares implicadas en la síntesis replicativa y expresión génica	46
4. Proteínas celulares implicadas en <i>splicing</i> de mRNAs virales	48
5. Proteínas celulares implicadas en el transporte de mRNAs virales	48
6. Proteínas celulares implicadas en la traducción viral	48

7. Proteínas celulares importantes para la salida de las RNPs del núcleo	49
8. Factores celulares que interaccionan con la polimerasa in vivo.	
Localización y función celular de SFPQ/PSF	49

Terapia antigripal

1. Enfermedad de gripe y antivirales disponibles	51
2. Antivirales en fases de desarrollo clínico.....	51

OBJETIVOS.....	57
----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	61
----------------------------	----

Materiales

1. Líneas celulares eucariotas	61
2. Cepas bacterianas.....	61
3. Cepas virales	61
4. Plásmidos	61
5. Anticuerpos	62
6. Silenciadores	62
7. Compuestos químicos.....	63

Métodos

1. Manipulación de ADN y clonajes.....	63
1.1 Clonaje del plásmido pHH21-EGFP	63
1.2 Clonaje del plásmido pcDNA3-SFPQ/PSF-FLAG	64
2. Análisis de RNAs	64
2.1 Aislamiento de RNA total de la célula	64
2.2 Purificación de mRNA por cromatografía de oligo-dT-celulosa	64
2.3 Detección y cuantificación del RNA	65
2.3.1 Hibridación <i>Dot-Blot</i>	65
2.3.1.1 Marcaje de sondas para la detección de RNAs.....	65
2.3.1.2 Obtención de ribosondas para la detección de cRNA de los segmentos virales M, NP y NS	65
2.3.2 RT-qPCR para la detección de mRNAs del segmento NS sin procesar y procesados mediante <i>splicing</i>	67
2.3.3 RT-qPCR para la detección de mRNAs del segmento NP.....	67
3. Manipulación de cultivos celulares.....	68
3.1 Mantenimiento de cultivos celulares.....	68
3.2 Transfecciones y reconstituciones de RNPs	69
3.2.1 Fosfato cálcico	69
3.2.2 Reconstitución de RNPs recombinantes.....	69
3.2.3 Lipofectamina 2000	69

3.3 Adición de compuestos químicos	69
3.3.1 En el contexto de la reconstitución de RNPsGFP	69
3.3.2 En el contexto de la infección	69
3.4 Ensayo de viabilidad celular	70
4. Silenciamiento génico mediante siRNAs	70
5. Técnicas virológicas	70
5.1 Infecciones	70
5.1.1 Por virus de la gripe	70
5.1.2 Por virus VSV	70
5.1.3 Por Adenovirus	71
5.2 Generación de <i>stocks</i> de virus	71
5.3 Curvas de crecimiento	71
5.4 Titulación de virus de la gripe y VSV mediante ensayo de formación de placa	71
5.5 Titulación de Adenovirus mediante inmunocitoquímica	72
6. Análisis de proteínas	72
6.1 Inmunofluorescencia	72
6.2 Inmunodetección de proteínas (<i>Western-Blot</i>)	73
6.3 Inmunoprecipitación	73
6.4 Marcaje metabólico <i>in vivo</i> de proteínas celulares y virales	74
7. Purificación de RNPs mediante cromatografía de afinidad con la etiqueta de poli-histidinas	74
8. Análisis de la actividad de las RNPs	74
8.1 Transcripción <i>in vitro</i>	74
8.2 Determinación de proteína CAT mediante ELISA	75
8.3 Cuantificación de la fluorescencia de GFP mediante procesamiento de imágenes con el programa <i>ImageJ</i>	75
9. Análisis de la composición de los compuestos químicos	75
10. Ensayos de patogénesis en ratones	75
10.1 Administración de los compuestos a los ratones por vía oral	75
10.2 Inoculación y manejo de ratones infectados	76
10.3 Seguimiento de enfermedad y análisis de virulencia	76
11. Análisis de RNAs por secuenciación masiva	76
11.1 Purificación de RNAs	76
11.2 Análisis bioinformático	76

RESULTADOS	81
-------------------------	-----------

Caracterización de uno de los factores celulares asociados a la polimerasa viral (SFPQ/PSF) durante la infección por el virus de la gripe

1. Análisis de la asociación de la proteína SFPQ/PSF con las RNPs virales durante la infección.....	81
2. Análisis de la relevancia de la proteína SFPQ/PSF durante la infección ...	82
2.1 Efecto del silenciamiento del factor SFPQ/PSF en la producción viral	82
2.2 Relevancia de SFPQ/PSF para la infección por virus de otras familias.....	84
2.3 Impacto del silenciamiento de la proteína p54nrb/NonO en la producción viral.....	85
3. Caracterización de la función de SFPQ/PSF durante la infección	85
3.1 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en la localización de RNPs virales durante la infección.....	85
3.2 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en el <i>splicing</i> de mRNAs virales	86
3.3 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en la acumulación de RNAs virales	87
3.4 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en la transcripción primaria del virus de la gripe	88
3.5 Estudio del efecto de SFPQ/PSF en la replicación y/o transcripción secundaria del virus	89
3.6 Efecto de la sobre-expresión de SFPQ/PSF en los niveles de mRNA viral	90
4. Estudio del mecanismo molecular de acción del factor SFPQ/PSF durante la transcripción viral.....	92
4.1 Efecto de SFPQ/PSF en la iniciación de la transcripción <i>in vitro</i> de RNPs recombinantes	92
4.2 Análisis de la contribución de SFPQ/PSF a la poliadenilación de mRNAs virales	92
4.3 Dependencia de la secuencia de la señal de poliadenilación de gripe en la función de SFPQ/PSF durante la transcripción viral.....	94

Identificación de compuestos inhibidores de la transcripción/replicación del virus de la gripe

1. Generación de un sistema de replicón para el rastreo de compuestos inhibidores del virus de la gripe.....	96
1.1 Utilización de un sistema de reconstitución de RNPs virales basado en la expresión de la proteína GFP	96
1.2 Adaptación del sistema de replicón para hacer un rastreo de compuestos a media escala	96

2. Rastreo de compuestos aprobados para uso clínico para identificar inhibidores de la infección por el virus de la gripe.....	97
2.1 Descripción de la librería y diseño del rastreo de compuestos.....	97
2.2 Búsqueda de compuestos que no presenten toxicidad y bloqueen de forma específica los procesos de replicación y/o expresión génica virales.....	98
2.3 Identificación del compuesto seleccionado C9 en las bases de datos de compuestos químicos y estudio de su perfil farmacológico y toxicológico .	99
3. Caracterización del compuesto C9 en células humanas	100
3.1 Determinación de la toxicidad y de la eficacia del compuesto C9 en células pulmonares humanas	100
3.2 Efecto del compuesto C9 en la síntesis de proteínas virales y celulares...	101
3.3 Efecto del compuesto C9 en la acumulación de mRNAs del virus de la gripe	102
3.4 Efecto del C9 en la actividad transcripcional <i>in vitro</i> de las RNPs virales	103
4. Estudio de la efectividad antigripal del compuesto C9 en el modelo murino	103
4.1 Ensayo preclínico del compuesto en ratones infectados con dosis letales del virus de la gripe	104
4.2 Efecto del compuesto en la síntesis de proteínas celulares y virales en células de ratón	105
5. Búsqueda de la diana antiviral del compuesto C9	105
DISCUSIÓN	113
Dos estrategias para identificar nuevas vías celulares importantes para la replicación y expresión génica viral.....	113
1. Proteómica de la polimerasa viral: una estrategia descriptiva.....	113
2. Rastreo de compuestos químicos con actividad antiviral: una estrategia funcional.....	114
Identificación de la proteína SFPQ/PSF como nuevo factor asociado a la polimerasa viral que participa en la poliadenilación de mRNAs virales	115
1. SFPQ/PSF se requiere específicamente para la infección por el virus de la gripe	115
2. La proteína SFPQ/PSF parece esencial para llevar a cabo el ciclo infectivo de gripe	116
3. Un factor de <i>splicing</i> celular es parasitado para la transcripción viral	117

4. Participación de SFPQ/PSF en la poliadenilación del virus de la gripe	117
<i>Montelukast sodium</i> como potencial antigripal.....	118
¿Pueden utilizarse las vías celulares importantes para la multiplicación viral como una nueva diana terapéutica?	119
CONCLUSIONES.....	123
BIBLIOGRAFÍA.....	127
ANEXO	147

ABREVIATURAS

A: Adenosina
aa: aminoácido
BSA: Seroalbúmina bovina (*Bovine serum albumin*)
cap: caperuza
cat: cloranfenicol acetil transferasa
CC₅₀: concentración de citotoxicidad 50 %
cDNA: DNA complementario
CMV: promotor de Citomegalovirus
CPSF: Factor de especificidad del corte y la poliadenilación
CPSF30: Subunidad de 30Kda del Factor de especificidad del corte y la poliadenilación
col: colaboradores
cRNA: RNA viral de polaridad positiva.
cRNP: RNP que encapsida una molécula de cRNA
C-terminal: Extremo carboxilo terminal
CTD: dominio carboxilo terminal
DEPC: Dietil pirocarbonato
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNAsa: Desoxirribonucleasa
DTT: DL-Ditiotreitol
eIF4G: Factor de iniciación eucariota 4G
FC: cambio múltiplo
FDR: tasa de descubrimiento de falsos
GFP: Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
h: Hora
HA: Hemaglutinina
His: Histidinas
hpi: Horas post-infección
HPRI: Inhibidor de RNAsa de placenta humana
hpt: Horas post-transfección
IC₅₀: concentración inhibitoria 50 %
IF: Inmunofluorescencia
IFN: Interferón
INS: región de inestabilidad
KDa: Kilodalton
LD₅₀: dosis letal 50 %
lincRNA: RNA largo no codificante
log: logaritmo en base 10
M: Molar
M1: Proteína de matriz 1
M2: Proteína de matriz 2
MDCK: Células de riñón de perro Madin Darby (*Madin Darby canine kidney cell*)
mdi: Multiplicidad de infección
min: Minuto
mm: milímetro
mRNA: RNA mensajero (*messenger RNA*)
MTT: 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NA: Neuraminidasa
NEP: Proteína de exportación nuclear del virus de la gripe (NS2)
NES: Señal de exportación nuclear (*Nuclear export signal*)

NLS: Señal de localización nuclear (*Nuclear localisation signal*)
nm: nanómetro
NP: nucleoproteína
NS1: Proteína no estructural del virus de la gripe
nt: Nucleótido
N-terminal: Extremo amino terminal
ORF: *Open Reading Frame* o Fase de lectura abierta
PA: Proteína ácida del virus de la gripe
pb: pares de bases
PABPI: Proteína de unión a colas de poliA I (*Poly(A) binding protein I*)
PABPII: Proteína de unión a colas de poliA II (*Poly(A) binding protein II*)
PB1: Proteína básica 1 del virus de la gripe
PB2: Proteína básica 2 del virus de la gripe
PBS: tampón fosfato salino
PBSc: PBS completo
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pre-mRNA: Precursor de RNA mensajero
RRM: Dominio de unión a RNA
RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente (*RNA dependent RNA polymerase*)
RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
RNAsa: Ribonucleasa
RNP: ribonucleoproteína
rRNA: RNA ribosomal
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.
SBF: suero bovino fetal
SDS: dodecilsulfato sódico (*sodium dodecylsulphate*)
splicing: Procesamiento de RNAs mensajeros
snRNA: RNA nuclear pequeño
ssRNA: RNA de cadena sencilla
SV40: Virus 40 de simio
TA: temperatura ambiente
U6 snRNA: RNA nuclear pequeño U6 (*small nuclear RNA U6*)
U: Uridina
ufp: Unidades formadoras de placa
UTR: Región no traducida (*Untranslated region*)
Vic: cepa Victoria del virus de la gripe
vRNA: RNA viral genómico de polaridad negativa
vRNP: RNP que encapsida una molécula de vRNA
WB: Western blot
WSN: Cepa A/WSN/33

SUMMARY

The influenza A viruses are members of the Orthomyxoviridae family and cause yearly epidemics and occasional more severe pandemics of respiratory infections. Although influenza in humans is usually resolved without complications, the infection can be more severe in the young infants, in the elderly and in persons with previous medical conditions. Thus, influenza leads to 250.000-500.000 deaths per year and these numbers can be much larger in a pandemic.

The genome of influenza A viruses is fragmented into 8 single-stranded RNA molecules of negative polarity that together with the heterotrimeric polymerase complex (PA, PB1 and PB2) and the nucleoprotein (NP), form ribonucleoprotein complexes (RNPs). These RNPs are responsible for the replication and transcription of the virus genes in the nucleus of the infected cells. Although at present we have effective influenza antivirals available targeting virus dissemination, the appearance of resistant mutant viruses poses a serious limitation for their widespread use. Antiviral drugs that target cellular proteins may play major roles in combating virus resistance. In the present work we propose two different strategies to identify cellular proteins with potential antiviral activity.

The first strategy is based in the characterisation of the complexes formed intracellularly by the influenza polymerase in human cells. Several influenza polymerase-associated proteins were identified by MALDI-MS. Here we characterise the role of one such host factors, SFPQ/PSF, during virus infection. Down-regulation of SFPQ/PSF by silencing with two independent siRNAs reduced the virus yield by 2-5 log in low-multiplicity infections, while the replication of unrelated viruses as VSV or Adenovirus was almost unaffected. Immunofluorescence analyses showed a good correlation between SFPQ/PSF and NP levels in infected cells. Analysis of virus RNA accumulation in silenced cells showed that production of mRNA, cRNA and vRNA is reduced by more than 5-fold but splicing is not affected. Likewise, the accumulation of viral mRNA in cycloheximide-treated cells was reduced by 3-fold. In contrast, down-regulation of SFPQ/PSF in a recombinant virus replicon system indicated that, while the accumulation of viral mRNA is reduced by 5-fold, vRNA levels are slightly increased. In vitro transcription of recombinant RNPs generated in SFPQ/PSF-silenced cells indicated a 4-5-fold reduction in polyadenylation but no alteration in cap snatching. These results indicate that SFPQ/PSF is a host factor essential for influenza virus transcription that increases the efficiency of viral mRNA polyadenylation and open the possibility to develop new antivirals targeting the accumulation of primary transcripts, a very early step during infection.

The second strategy is based in the screen for new anti-influenza inhibitors targeted to viral RNA replication or transcription in a recombinant virus replicon system. We proposed to use collections of compounds that have been previously studied for the therapy of human pathologies and hence have known toxicology and pharmacological profiles. This approach could allow the rapid progress to the market of new effective influenza antivirals. The compounds that showed activity in the basic screen were tested for their anti-influenza activity in cultured infected cells. Two compounds inhibited the influenza virus strains used in cell cultures from different origins: Ribavirin, a previously described anti-influenza compound, and Montelukast sodium. Subtoxic concentrations of Montelukast sodium inhibited the viral proteins synthesis. The identification of the target of this compound could reveal new cellular pathways important for influenza virus infection.

INTRODUCCIÓN

El virus de la gripe

1. Historia y epidemiología

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, que ha afectado al hombre desde tiempos inmemoriales. El documento histórico más antiguo en el que se hace referencia a una posible epidemia gripal data del año 412 a. C y fue escrito por Hipócrates (Murphy, B.R y Webster, 1996). El término *influenza*, con el que se nombra en inglés al virus de la gripe, se acuñó en el Renacimiento. El hecho sorprendente de que la enfermedad afectara de forma indiscriminada a los distintos estamentos sociales hizo que este mal transitorio se atribuyera a la influencia (*influenza* en italiano) de una conjunción de astros sobre las personas. En 1930, se propuso que un virus podría ser el causante de la enfermedad, al recuperar el agente infeccioso tras la filtración de moco de un cerdo infectado (Shope, 1931). Dos años más tarde se consiguió aislar el virus de la gripe de una persona infectada (Smith y col., 1933). Desde ese primer aislado hasta nuestros días se han realizado multitud de estudios con el objetivo de profundizar en la biología molecular del virus de la gripe y de obtener antivirales y vacunas eficaces contra el mismo. A pesar de ello, los virus de la gripe son uno de los patógenos conocidos a los que se ha atribuido más mortalidad y morbilidad a lo largo de la historia. Este virus causa epidemias responsables de la muerte de 250.000 a 500.000 personas al año y pandemias ocasionales mucho más devastadoras.

Las epidemias estacionales son resultado de mutaciones puntuales en las secuencias génicas virales, que generan pequeños cambios antigénicos (deriva antigénica) capaces de eludir la respuesta inmune del hospedador. Estas mutaciones puntuales tienen una frecuencia de aparición estimada de entre 10^{-4} y 10^{-5} por nucleótido y son consecuencia de

la baja fidelidad de copia y de la ausencia de una actividad correctora de errores de la polimerasa del virus de la gripe (Parvin y col., 1986; Suárez y Ortín, 1994).

Las pandemias son causadas por cambios antigénicos más drásticos (saltos antigénicos). Los virus pandémicos expresan proteínas virales para las que las personas infectadas no han desarrollado una memoria inmune. Estas proteínas virales pueden ser introducidas en la población humana a través del intercambio de segmentos génicos de virus humanos, aviáres y/o porcinos o directamente desde virus aviáres o porcinos que adquieren la capacidad de infectar humanos (Horimoto y Kawaoka, 2005).

Las aves silvestres son los reservorios naturales del virus de la gripe, que infectan su tracto intestinal sin producir sintomatología. Hay indicios que hacen pensar que el virus causante de la pandemia de 1918, que provocó de 20 a 40 millones de muertes, era de origen aviar y adquirió la capacidad de infectar humanos (Neumann y Kawaoka, 2006). Las cepas causantes de las pandemias de 1957 y 1968 se generaron tras un intercambio de segmentos virales de origen aviar y humano (**Figura 11**).

Los cerdos pueden ser infectados por virus de la gripe de origen aviar y humano y constituyen un ambiente propicio para la recombinación de estos virus. Por ejemplo, la pandemia del 2009 fue causada por un virus de origen porcino que portaba además segmentos virales de origen aviar y humano (Tharakaraman y col., 2013). La patogenicidad de esta cepa fue leve y no causó una elevada mortalidad, a pesar de la buena transmisibilidad del virus entre humanos.

Por tanto, además de la capacidad del virus de la gripe para evadir la respuesta inmune del hospedador mediante un constante cambio antigénico, la

principal dificultad que presenta el control eficaz de la infección por el virus de la gripe es su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador. Todos estos hechos hacen que tanto el estudio a nivel molecular como el control epidemiológico del virus de la gripe sigan teniendo una gran importancia socio-económica.

2. Clasificación taxonómica

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Esta familia se caracteriza por tener una envuelta lipídica y un genoma segmentado de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa.

Los virus de esta familia se clasifican en cinco

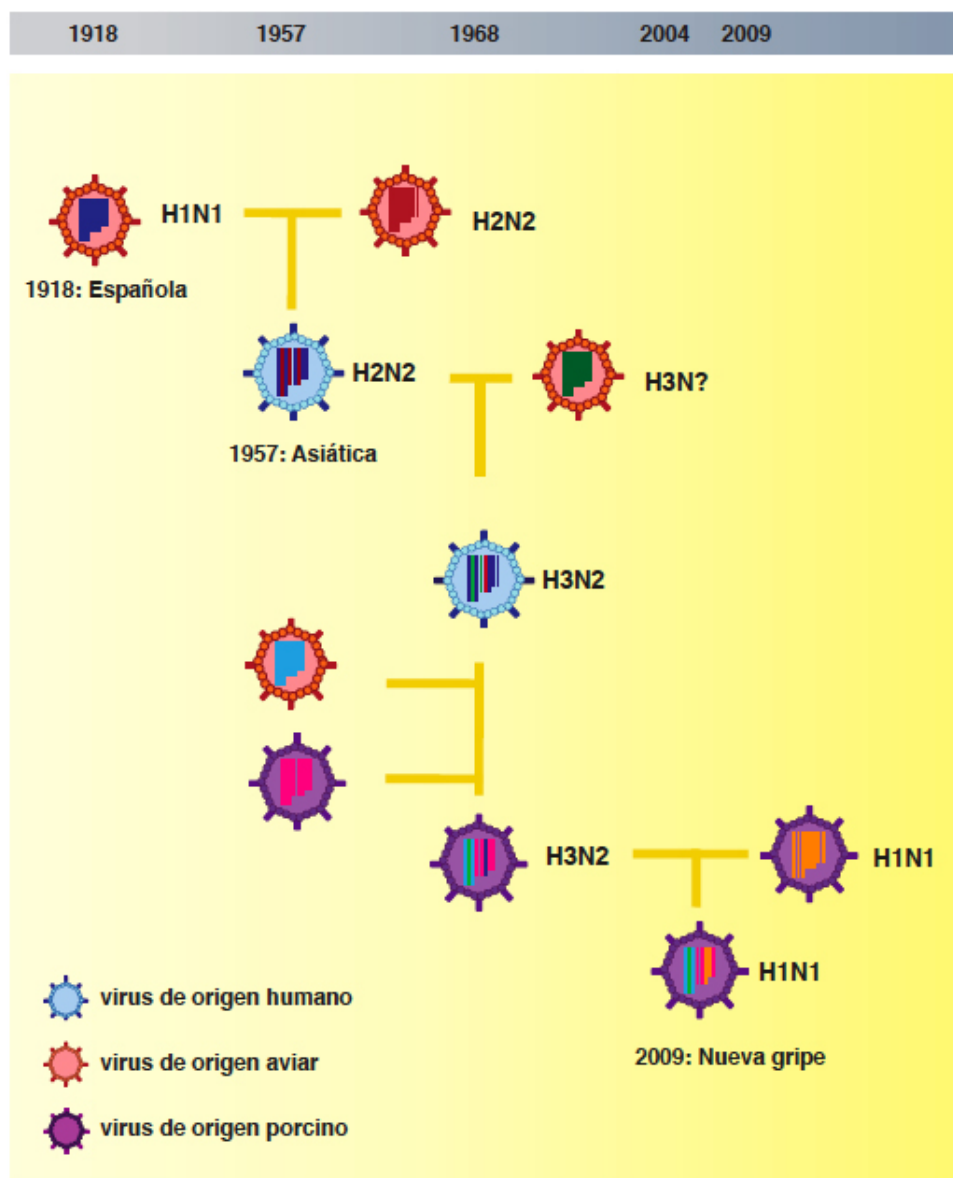


Figura I1. Pandemias producidas por los virus de la gripe desde el siglo pasado. El virus causante de las pandemia de 1918 (H1N1) era de origen aviar y mediante un salto de especie se adaptó a replicar en humanos. Los virus causantes de las pandemias de 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2) fueron producto de un cambio antigénico por intercambio de segmentos entre virus aviares y humanos. H2N2 adquirió los segmentos PB1, HA y NA de virus aviares, mientras que H3N2 adquirió los segmentos PB1 y HA. El virus causante de la pandemia de 2009 (H1N1) era una triple recombinación de segmentos aviares, porcinos y humanos. Los segmentos HA, NP y NS eran de origen porcino, PB1 de origen humano, y PB2, PA, NA y M de origen aviar. Adaptado de (Neumann, Noda, & Kawaoka, 2009) y (Jorba, 2009).

géneros: *Influenzavirus A* que presenta 8 segmentos genómicos e infecta humanos, otros mamíferos y una gran variedad de aves. Este género se divide a su vez en subtipos basándose en la naturaleza antigénica de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); *Influenzavirus B*, que contiene también 8 segmentos genómicos y únicamente infecta humanos; *Influenzavirus C* que contiene 7 segmentos genómicos e infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus* que infecta insectos y está formado por los subgéneros *Thogoto* (6 segmentos genómicos) y *Dhori* (7 segmentos genómicos); y el género *Isavirus* que presenta 8 segmentos genómicos e infecta peces.

Recientemente se han identificado virus de la gripe en murciélagos por lo que esta clasificación taxonómica podría verse ampliada en poco tiempo. Los análisis filogenéticos demuestran que hay más variedad de virus de la gripe en murciélagos que en aves y mamíferos juntos, indicando una larga asociación del virus con este huésped y proponiéndolo como un nuevo reservorio del virus de la gripe (Tong y col., 2013).

En esta Memoria se hará referencia exclusivamente al género *Influenzavirus A* ya que es el que afecta de forma más importante a humanos causando epidemias y pandemias y por ello constituye el principal modelo de estudio del laboratorio.

3. La partícula viral

Las partículas del virus de la gripe son pleomórficas pero con tendencia a adquirir formas esféricas o filamentosas según la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne y col., 1960; Hoyle y col., 1961). Los viriones tienen un diámetro entre 80 y 120 nm, aunque los filamentosos, que son los más frecuentes en las muestras clínicas, pueden llegar a los 300 nm de longitud.

3.1 Proteínas virales

La envuelta lipídica deriva de la membrana plasmática de las células infectadas. En esta envuelta se anclan las glicoproteínas HA y NA que forman espículas radiales de 10 a 14 nm en la superficie del virión (**Figura I2**). Las dos proteínas son determinantes antigénicos contra los que se dirige la respuesta inmunológica humoral neutralizante. La proteína **HA** forma un homotrímero cuya estructura y función están muy conservadas en todos los virus a pesar de la variación de su secuencia. Las funciones más importantes de HA son el reconocimiento del receptor celular (el ácido siálico) y la fusión de la membrana viral con la celular para permitir la entrada del virus (Weis y col., 1988). La glicoproteína **NA** forma un homotetrámero con forma de bastón (Colman y col., 1983). Esta proteína tiene actividad neuraminidasa que permite el corte de los residuos de ácido siálico presentes tanto en los viriones progenie, evitando su agregación, como en la membrana celular, favoreciendo la salida del virus de la célula infectada y permitiendo su avance a través de la matriz extracelular de las mucosas (Palese y Schulman, 1976).

En la envuelta del virión también se ancla la proteína **M2** aunque en cantidades mucho menores (Zebedee y Lamb, 1988). Esta proteína forma tetrámeros que constituyen un canal iónico transmembrana (Sansom y col., 1997) esencial para la liberación de las ribonucleoproteínas (RNPs) al citoplasma durante la entrada del virus a la célula mediada por endocitosis (Takeda y col., 2002).

Bajo esta envuelta se encuentra el armazón proteico del virus constituido por la proteína **M1**, que es la más abundante del virión, e interacciona tanto con los tallos citoplasmáticos de las proteínas de la envuelta, como con las RNPs del interior (Enami y Enami, 1996; Ye y col., 1987). La proteína

NEP es la proteína estructural menos abundante y está implicada en la exportación de las RNPs al citoplasma (O'Neill *y col.*, 1998). Otra función de NEP es la regulación de la transcripción y replicación del RNA viral de manera independiente a la exportación de las RNPs (Robb *y col.*, 2009).

En el interior de la partícula viral se localiza el genoma segmentado del virus que consiste en 8 moléculas de RNA, que se asocian a un conjunto de proteínas virales formando las RNPs. Los extremos de cada uno de estos segmentos presentan complementariedad parcial e invertida. Al interaccionar entre sí constituyen el promotor viral al que se ancla la polimerasa del virus, que es un heterotrímero formado por las subunidades **PB1, PB2 y PA**. El resto del segmento de RNA está recubierto por subunidades de la proteína **NP**. Estas estructuras ribonucleoproteicas son las encargadas de llevar a cabo los procesos de transcripción y replicación.

Durante la infección también se expresan otras proteínas virales que no se encuentran en el virión. Estas proteínas son **NS1, PB1-F2, N40, PA-X, PA-152 y PA-182**. La proteína no estructural NS1 es un factor de virulencia que desempeña múltiples funciones accesorias durante la infección (Hale *y col.*, 2008). Aunque la principal función de NS1 es la inhibición de la respuesta inmune iniciada por la célula infectada (Fernandez-Sesma, 2007), también participa en la modulación del proceso de *splicing* del mRNA viral (Garaigorta y Ortin, 2007), en el procesamiento del extremo 3' (Chen *y col.*, 1999) y en el transporte núcleo-citoplásmico de los mRNAs celulares (Fortes *y col.*, 1994). Además, regula la actividad de la polimerasa viral (Hatada y Fukuda, 1992; Hatada *y col.*, 1997; Marión *y col.*, 1997a), participa en la morfogénesis (Garaigorta *y col.*, 2005) y estimula selectivamente la traducción de los mRNAs virales (Aragón *y col.*, 2000; Burgui *y col.*, 2003; de la Luna *y col.*, 1995).

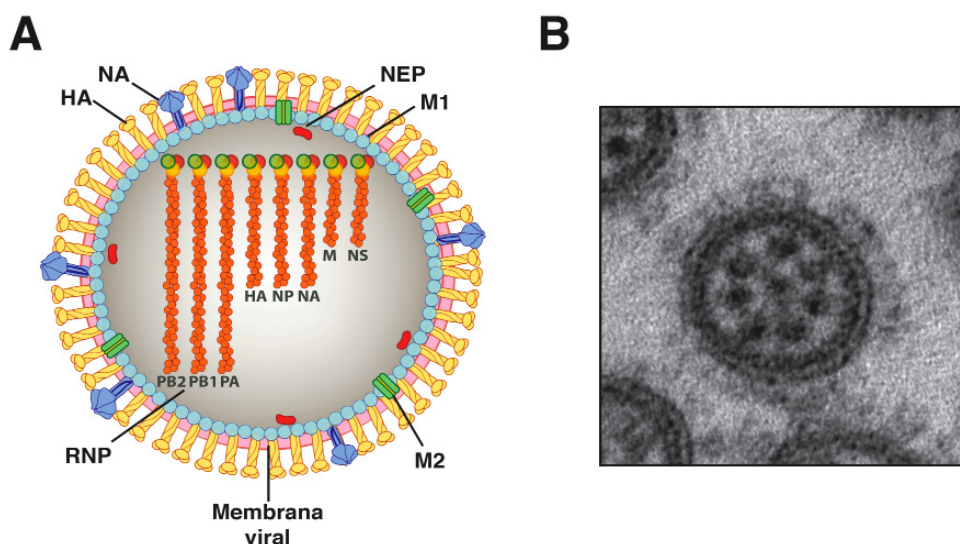


Figura 12. El virus de la gripe. (A) Representación gráfica de una partícula viral en la que se indican las proteínas estructurales del virus, las ocho RNPs y la membrana viral derivada de la membrana celular. Adaptado de Tesis de Núria Jorba. (B) Micrografía electrónica de un virión del virus de la gripe. Los puntos electrodensos en el interior del virión corresponden a las RNPs. Se observan siete RNPs ordenadas en forma de anillo con una octava RNP central. Adaptado de (Noda et al., 2006).

Las proteínas **PB1-F2** y **N40** son sintetizadas a partir de una fase de lectura y un codón de iniciación alternativos del mRNA del segmento PB1, respectivamente (Chen *y col.*, 2001; Wise *y col.*, 2009). PB1-F2 se localiza en la membrana mitocondrial y se relaciona con procesos apoptóticos (Gibbs *y col.*, 2003). También está implicada en la regulación de la polimerasa cuando interactúa con PB1 (Mazur *y col.*, 2008). La proteína N40 es una versión truncada de PB1 que carece de actividad transcriptasa y cuya eliminación provoca una disminución en la actividad replicativa en ciertos fondos genéticos (Wise *y col.*, 2009).

Recientemente se han caracterizado tres nuevas proteínas derivadas del segmento 3 del virus de la gripe, **PA-X**, **PA-152** y **PA-182**. Aunque por el momento se desconocen muchos detalles de estas proteínas, se sabe que PA-X modula la respuesta de la célula hospedadora frente a la infección (Jagger *y col.*, 2012), y se ha observado que un virus que carece de las proteínas PA-152 y PA-182 disminuye significativamente su replicación y patogenicidad (Muramoto *y col.*, 2013).

3.2 Organización genómica y RNAs virales sintetizados en la célula infectada

El genoma del virus de la gripe está formado por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis *y col.*, 1976). El genoma completo del virus comprende alrededor de 13.500 nucleótidos, según la cepa, y la longitud de los segmentos individuales se encuentra entre 890 y 2.341 nucleótidos (**Figura I3**). En la célula infectada cada segmento codifica una proteína, excepto los segmentos 2, 3, 7 y 8 que codifican varias, y en total se expresan 15 proteínas virales (Chen *y col.*, 2001; Lamb y Choppin, 1979; Lamb *y col.*, 1980, 1981). El mRNA del segmento 2 (PB1) tiene dos pautas de lectura abierta a partir de las cuales se expresan las

proteínas PB1 y PB1-F2, y un codón de iniciación alternativo que da lugar a la expresión de la proteína N40. El segmento 3 presenta dos pautas de lectura abierta que permiten la expresión de PA y PA-X. Además, a partir del mRNA de PA y utilizando codones AUG internos, se generan las proteínas PA-152 y PA-182. Los mRNAs generados a partir de los segmentos 7 y 8 se sintetizan por *splicing* alternativo y dan lugar a la expresión de dos proteínas en cada caso (M1 y M2 del segmento 7, NS1 y NEP del segmento 8).

Se pueden distinguir tres formas distintas de RNA viral sintetizadas por la polimerasa dependiente de RNA dentro de la célula infectada (**Figura I4**). La naturaleza, función y procedencia de cada uno de ellos se describen a continuación:

3.2.1 vRNAs o RNAs genómicos

Los RNAs genómicos constituyen la forma de RNA presente en los viriones y son cadenas sencillas de RNA de polaridad negativa. Presentan en sus extremos 5' un grupo trifosfato y en su extremo 3' un grupo -OH (Young y Content, 1971). Todos los segmentos virales presentan unas secuencias conservadas de 12 o 13 nucleótidos en sus extremos 3' y 5' respectivamente (Desselberger *y col.*, 1980; Robertson, 1979) que poseen complementariedad parcial e invertida. Debido a esta característica, estos extremos forman una estructura en forma de mango de sartén o *panhandle* (Hsu *y col.*, 1987), que permite la conformación circular del RNA y que constituye el sitio de anclaje de la polimerasa viral. Estos extremos conservados constituyen el promotor viral y son relevantes para los procesos de replicación, transcripción, poliadenilación y empaquetamiento. Además, los vRNAs contienen un tramo corto de entre 5 y 7 uridinas cerca del extremo 5', que constituye la señal de poliadenilación (Robertson *y col.*, 1981a).

Los vRNAs siempre se encuentran asociados con múltiples monómeros de NP y la enzima polimerasa formando complejos de RNPs (vRNPs) (Arranz *y col.*, 2012; Coloma *y col.*, 2009; Martín-Benito *y col.*, 2001; Neumann *y col.*, 2004).

3.2.2 cRNAs o RNAs complementarios

Son una copia completa y de polaridad positiva del vRNA que se generan mediante el proceso de replicación. Los cRNAs son RNAs intermediarios de la replicación viral, ya que se utilizan como

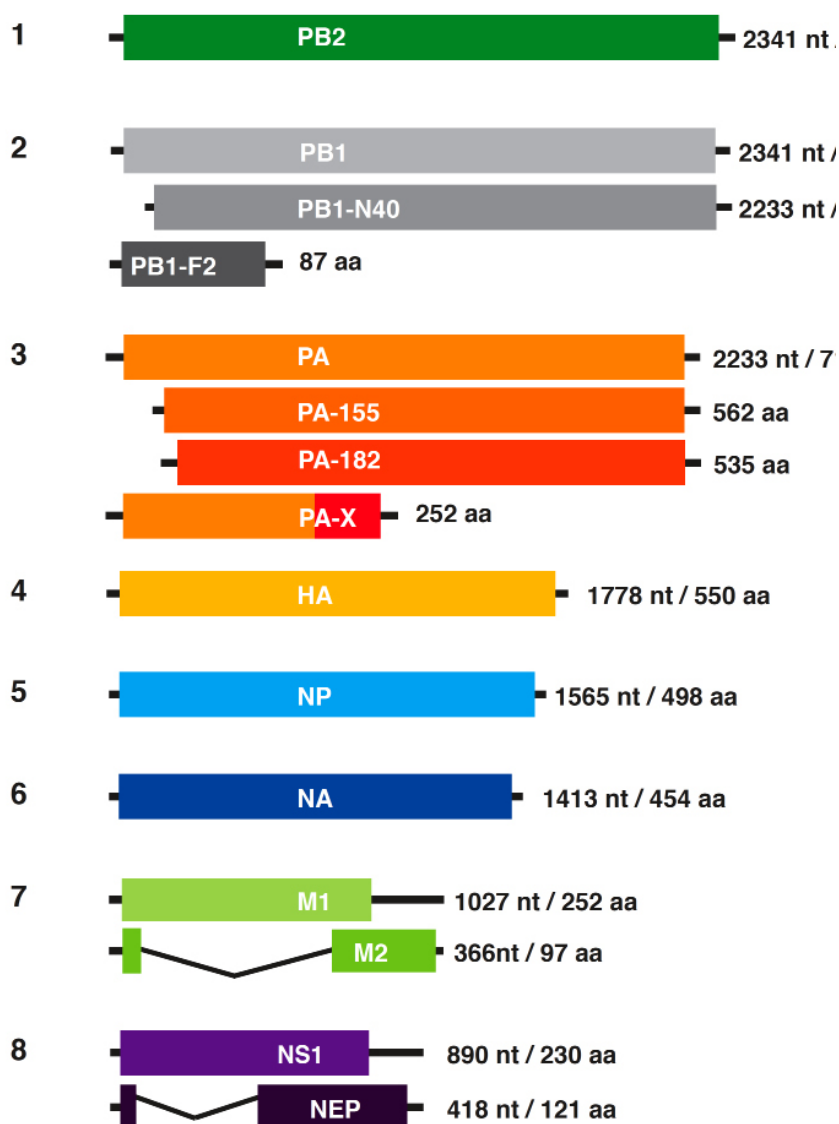


Figura I3. Estructura del genoma del virus de la gripe. Se representan cada uno de los segmentos de gripe. El número del segmento se muestra a la izquierda y la longitud tanto del segmento (en nucleótidos) como de la proteína que codifican (en aminoácidos), a la derecha. Las regiones codificantes se representan como cajas coloreadas, los extremos no codificantes como líneas negras y los intrones como líneas en forma de V. Adaptado de (Jorba, 2009).

molde para generar múltiples copias de vRNA que serán incorporadas a la progenie viral. El promotor del cRNA, al igual que el del vRNA, tiene una estructura en forma de *panhandle*, pero se han identificado diferencias estructurales entre ambos que son responsables de su distinta funcionalidad (Bae y col., 2001), probablemente porque inducen un reconocimiento diferente por parte de la polimerasa (González y Ortín, 1999). Durante la infección viral la cantidad de cRNA sintetizado es muy inferior a la cantidad de vRNA y se propone que las diferencias estructurales en los promotores podrían ser un mecanismo de regulación de los niveles de estos RNAs en la célula infectada (Deng y col., 2006).

Al igual que el vRNA, el cRNA se encuentra en todo momento formando cRNPs, pero éstas nunca salen del núcleo de la célula infectada (Krug y col.,

1987) y no se encapsidan en los nuevos viriones.

3.2.3 mRNAs o RNAs mensajeros

Son generados durante los procesos de transcripción a partir de moléculas de vRNAs, y por lo tanto, tienen polaridad positiva. Son copias incompletas del vRNA ya que carecen de la zona complementaria al extremo 5'. En su lugar, poseen una cola de poli-A de longitud variable en su extremo 3'. Esta modificación se genera a través de la copia reiterada, mediada por la polimerasa viral, del tramo de uridinas cercano al extremo 5' del molde vRNA. En su extremo 5' presentan una estructura de caperuza o *cap* tipo 1 (m^7Gppp^mN) que deriva de los mRNAs celulares (Krug y col., 1979). Ambas modificaciones post-transcripcionales dan lugar a mRNAs virales estructuralmente indistinguibles de los celulares.

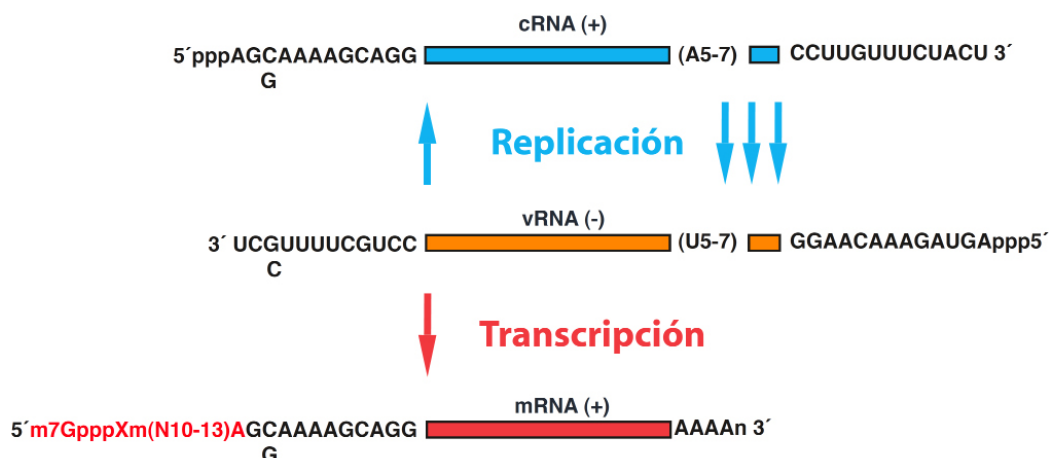


Figura I4. Síntesis de los distintos tipos de RNAs virales. Se representa en naranja el vRNA de polaridad negativa, que constituye la forma genómica a partir de la cual se generan el cRNA (color azul) y el mRNA (color rojo), ambos de polaridad positiva. El cRNA es una copia completa del vRNA que se genera tras el proceso de replicación y constituye el intermediario replicativo a partir del cual se sintetizan múltiples copias de vRNA. El mRNA viral se genera mediante el proceso de transcripción y contiene una secuencia cap tipo I derivada de los mRNAs celulares que se muestra en rojo así como una cola de poli-A ($AAAA_n$) sintetizada por la polimerasa viral mediante una copia reiterada de la señal de poliadenilación (U_{5-7}) presente en el vRNA.

3.3 La RNP viral

Los segmentos de RNA no existen como moléculas de RNAs desnudas sino que se asocian a la RNA polimerasa viral y a moléculas de nucleoproteína (NP) para dar lugar a complejos de RNPs (Portela y col., 1999) (**Figura I6**).

3.3.1 La polimerasa viral

La polimerasa viral es una RNA polimerasa dependiente de RNA formada por las subunidades PB1, PB2 y PA (Detjen y col., 1987; Digard y col., 1989) con una relación estequiométrica 1:1:1 (Honda y col., 1990; Kato y col., 1985). Las tres subunidades son necesarias para llevar a cabo los

procesos de transcripción y replicación viral en el núcleo de las células infectadas (Perales y Ortín, 1997).

Las interacciones que establecen estas tres subunidades dentro del complejo polimerasa se han estudiado mediante aproximaciones bioquímicas, genéticas y estructurales (Digard y col., 1989; González y col., 1996; Obayashi y col., 2008; Pérez y Donis, 1995; Sugiyama y col., 2009; Toyoda y col., 1996; Zürcher y col., 1996). El análisis de complejos polimerasa-anticuerpo permitió la localización intramolecular de los dominios de cada subunidad (Area y col., 2004) tal y como se observa en la **Figura I5**. Se ha determinado que PB1 funciona como la subunidad central del complejo y que

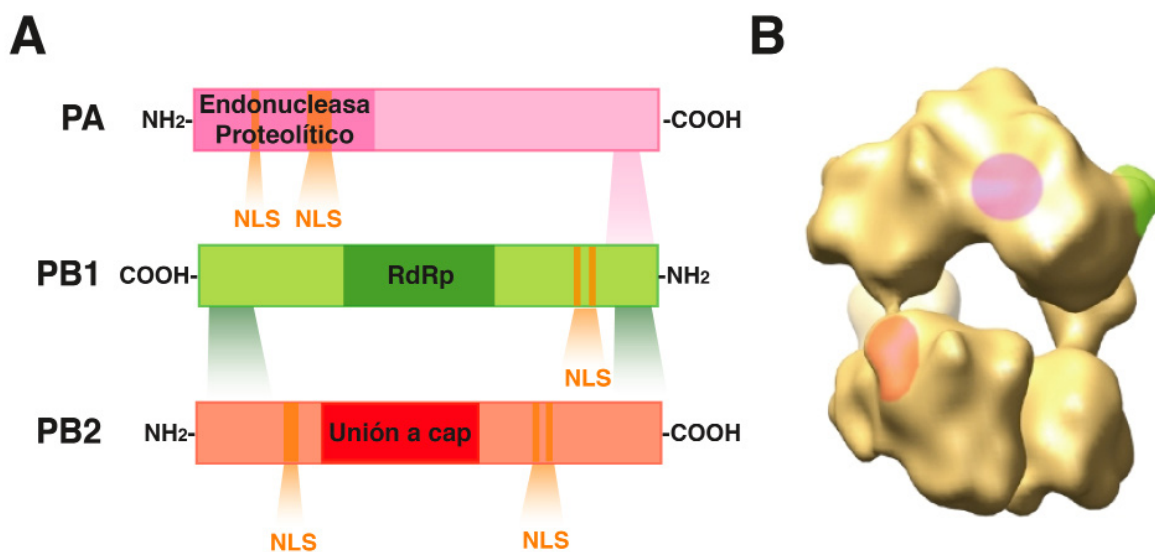


Figura I5. La polimerasa viral. (A) Se representan las tres subunidades de la polimerasa viral (PB1, PB2 y PA). Se destacan los dominios funcionales más representativos de ellas y las señales de localización nuclear (NLS). La subunidad PB1 tiene el dominio característico de una RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) y además conforma la subunidad central para el ensamblaje de PA y PB2. Se indican las regiones de interacción entre las distintas subunidades: los primeros 25 aminoácidos de la región N-terminal de PB1 son suficientes para interaccionar con los aminoácidos del 668-692 de PA (Ohtsu, Honda, Sakata, Kato, & Toyoda, 2002; Pérez & Donis, 1995). La región de PB1 que comprende del aminoácido 712 al 746 es suficiente para la interacción con el dominio comprendido entre los aminoácidos 51-259 de PB2 (González, Zürcher, & Ortín, 1996; Ohtsu et al., 2002; Poole, Medcalf, Elton, & Digard, 2007; Sugiyama et al., 2009). Sin embargo se han descrito dos regiones adicionales de interacción entre PB1 y PB2: la región N-terminal de PB1 (del aminoácido 48 al 145) (Biswas & Nayak, 1996) y la región C-terminal de PB2 (del aminoácido 488 al 759) (Hemerka et al., 2009). (B) La estructura tridimensional del complejo de la polimerasa de gripe determinada por microscopía electrónica (Coloma et al., 2009). Las áreas coloreadas indican la localización de los dominios específicos de las tres subunidades. En rosa se representa el C-terminal de PA, en verde el C-terminal de PB1 y en rojo, el N-terminal de PB2.

interacciona con PA a través de su extremo amino terminal (N-terminal), y con PB2 a través de su extremo carboxilo terminal (C-terminal). También se han descrito interacciones de las subunidades PB2 con PA y PB1 con PB2 (Biswas y Nayak, 1996; González y col., 1996; Pérez y Donis, 1995; Poole y col., 2004, 2007).

La estructura tridimensional de la polimerasa ha sido determinada por microscopía electrónica sobre distintas muestras sometidas a tinción negativa (Area y col., 2004; Arranz y col., 2012; Coloma y col., 2009; Resa-Infante y col., 2010; Torreira y col., 2007). Estos estudios indican que las tres subunidades se encuentran asociadas y formando una estructura compacta. No obstante, la polimerasa presenta una gran variabilidad conformacional dependiendo del contexto que se considera, lo que indica probablemente la alta flexibilidad del complejo. Esta flexibilidad explicaría la capacidad de la polimerasa de interactuar con RNA, proteínas virales y proteínas celulares para llevar a cabo funciones muy diversas. Aunque, como consecuencia de esta flexibilidad, la cristalización del complejo de la polimerasa no ha sido posible a día de hoy, se dispone de la estructura de algunos dominios de las subunidades del trímero (Dias y col., 2009; Guilligay y col., 2008; He y col., 2008; Tarendeau y col., 2007; Yuan y col., 2009). Cabe destacar la cristalización del dominio de unión a *cap* de PB2 y el dominio endonucleasa de PA contra los que actualmente se están diseñando antivirales.

3.3.1.1 La subunidad PB1

La proteína PB1 realiza la función de polimerización catalizando la adición secuencial de nuevos nucleótidos a la cadena de RNA naciente (Braam y col., 1983; Ulmanen y col., 1981). Para desempeñar esta función, necesita unirse a los distintos RNAs virales (Cianci y col., 1995; Hagen y col., 1994;

Huang y col., 1990; Perales y col., 2000). PB1 está evolutivamente muy conservada y en su secuencia se distinguen los cinco motivos de secuencia comunes a todas las RNA polimerasas dependientes de RNA (Kobayashi y col., 1996). Mutaciones puntuales en estos motivos afectan dramáticamente a su actividad (Biswas y Nayak, 1996; Mahy, 1983).

3.3.1.2 La subunidad PB2

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la iniciación de la transcripción ya que es la responsable del reconocimiento de estructuras *cap* en los mRNAs celulares que se usan como cebadores de la síntesis de mRNAs virales (Blaas y col., 1982; Plotch y col., 1981). Se ha resuelto la estructura del dominio responsable del reconocimiento y de la unión a *cap* por difracción de rayos X y se han determinado los residuos implicados en dicho reconocimiento (Guilligay y col., 2008). La proteína PB2 también participa en la replicación viral dado que mutantes puntuales en esta proteína dan lugar a alteraciones en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza y col., 2003).

3.3.1.3 La subunidad PA

La proteína PA es una fosfoproteína necesaria para la formación de una polimerasa activa (De la Luna y col., 1993; Sanz-Ezquerro y col., 1998). Se le ha atribuido actividad endonucleasa que, junto con su similitud estructural con las nucleasas de restricción de tipo II y el fenotipo de mutantes puntuales (Fodor y col., 2002), sugiere un papel fundamental en el corte endonucleotídico de los pre-mRNAs celulares para generar los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la transcripción viral (Dias y col., 2009; Yuan y col., 2009). Alternativamente, atendiendo al fenotipo de mutantes termosensibles, la subunidad PA parece implicada fundamentalmente en el proceso de replicación (Mahy, 1983). Se ha demostrado

además que PA tiene actividad proteolítica (Hara y *col.*, 2001; Sanz-Ezquerro y *col.*, 1995, 1996) y esta capacidad se ha relacionado con la degradación de la RNA polimerasa II celular (RNAP II) durante la infección (Rodríguez y *col.*, 2007, 2009).

3.3.2 La nucleoproteína

La nucleoproteína desempeña un papel esencial en la organización estructural de las RNPs. La estequiometría de la interacción de NP con el RNA

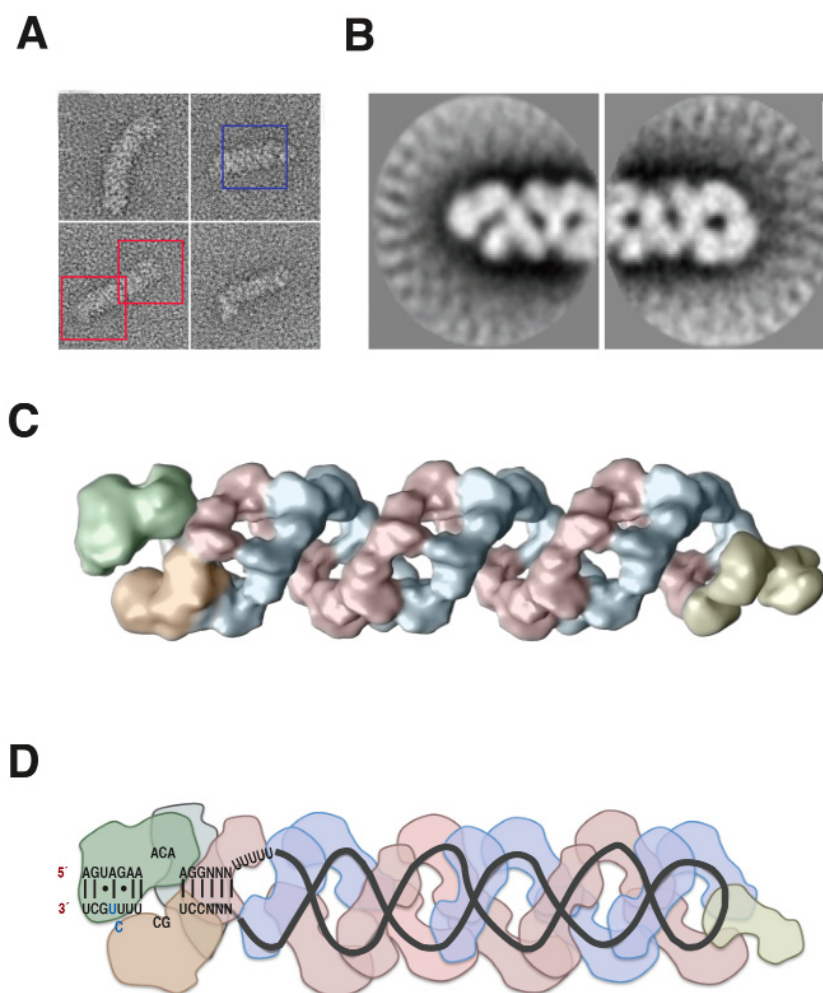


Figura 16. La ribonucleoproteína viral. (A) Imágenes de RNPs de viriones obtenidas por microscopía de tinción negativa. Los cuadrados rojos representan las áreas usadas para el procesamiento de las secciones terminales de la RNP (polimerasa y loop terminal) y los cuadrados azules las áreas usadas para el procesamiento del helicoide central (NP). (B) Medias bidimensionales obtenidas de las regiones terminales de la RNP. (C) Modelo tridimensional de la estructura de la RNP de viriones para el que se ha combinado el modelo propuesto para la zona helicoidal central con el modelo propuesto para los extremos. Se observa el complejo de la polimerasa unido al extremo (color naranja, verde y gris), el loop terminal (color amarillo) y las NPs formando un helicoide constituido por dos hebras anti-paralelas (color azul y rosa). (D) Diagrama del modelo tridimensional de la estructura de la RNP. Se destacan los nucleótidos conservados de los extremos 5' y 3' del RNA que según el modelo aceptado, conforman una estructura secundaria en forma de pandhandle (Palese, P. & Shaw, M. L., 2007) y funcionan como promotor viral. Las imágenes han sido tomadas de (Arranz et al., 2012).

es de una molécula de NP cada 24 nucleótidos (Ortega y col., 2000; Shaw y col., 1982). La NP es necesaria para la transcripción y replicación del genoma viral, ya que la polimerasa no es capaz de usar un RNA desnudo como molde (Honda y col., 1988). Es una proteína básica que oligomeriza y une RNA de cadena sencilla de manera cooperativa e independiente de secuencia ya que tiene alta afinidad por el esqueleto azúcar-fosfato, (Baudin y col., 1994; Kingsbury y col., 1987; Yamanaka y col., 1990). La unión de NP al RNA viral no protege a la RNP completamente de la acción de las RNAsas.

3.3.3 Estructura de la RNP

El estudio de RNPs de viriones mediante microscopía electrónica mostró que se trata de estructuras súper enrolladas con un *loop* terminal (Compans y col., 1972; Heggeness y col., 1982). El análisis estructural de las RNPs ha permitido determinar la presencia de la polimerasa viral en uno de sus extremos (Klumpp y col., 1997; Murti y col., 1988). Mediante el uso de un mini-genoma del virus ha sido posible la generación de RNPs recombinantes *in vivo* con la uniformidad necesaria para llevar a cabo estudios de microscopía electrónica de tinción negativa y procesamiento de imágenes, obteniéndose un modelo estructural con una resolución de 18 Å (Martín-Benito y col., 2001). Recientemente, se ha descrito la estructura de RNPs purificadas de viriones (Figura I6). En este modelo las RNPs forman una doble hélice en las que las moléculas de RNA tapizadas de NP presentan polaridad opuesta (Arranz y col., 2012).

4. El ciclo de infección

4.1 Adsorción y entrada de las partículas virales

El virus de la gripe infecta células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados. La glicoproteína HA de la superficie viral se une al

receptor por medio del ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos (Weis y col., 1988) (Figura I7-1). Tras la adsorción, la entrada del virus se produce por endocitosis mediada por receptor en vesículas de clatrina (Matlin y col., 1981; Sieczkarski y Whittaker, 2002).

Una vez formada la vesícula, ésta se fusiona con lisosomas dando lugar a endolisosomas con un interior ácido. El pH interno de los virus disminuye progresivamente gracias al canal iónico que forma la proteína M2 (Pinto y col., 1992). Este canal permite el paso de los protones desde los endolisosomas al interior de la partícula, lo que promueve la desestabilización de la interacción entre las RNPs y M1. Además, el pH ácido provoca un cambio conformacional de la proteína HA que induce la fusión de las membranas del virus y de la vesícula endocítica, y la liberación de las RNPs (Helenius, 1992) (Figura I7-2). Una vez en el citoplasma, las RNPs son transportadas al núcleo (Cros y col., 2005; O'Neill y col., 1995) (Figura I7-3) donde tendrán lugar los procesos de transcripción y replicación.

4.2 Transcripción primaria

4.2.1 Iniciación y elongación de los mRNAs virales

Para llevar a cabo la iniciación de la síntesis de mRNAs virales, la polimerasa emplea cebadores que obtiene de los mRNAs celulares mediante un proceso llamado “robo de *cap*” o *cap snatching* (Bouloy y col., 1978; Krug y col., 1979). Este proceso consiste en la unión de la polimerasa, por medio de PB2, al *cap* de los mRNAs celulares producidos por la RNAP II, seguido del corte endonucleolítico de estos RNAs mediado por PA. Los fragmentos generados tienen una longitud de 9 a 15 nucleótidos y una estructura 5' *cap*. La transcripción viral, por tanto, requiere una transcripción celular activa,

y compuestos que inhiben la RNAP II como la α -amanitina o la actinomicina D inhiben también la transcripción viral (Scholtissek y Rott, 1970). A continuación, estos cebadores son elongados por la polimerasa viral mediante la actividad RNA polimerasa RNA dependiente residente en PB1 (Klumpp y col., 1998) (**Figura I7-4**).

4.2.2 *Splicing* de mRNAs virales

Dos de los transcritos virales, los generados por los segmentos 7 y 8, son sustratos de *splicing* y dan lugar a la expresión alternativa de dos proteínas (M1 y M2, y NS1 y NEP respectivamente) (Inglis y Brown, 1981; Inglis y col., 1979; Lamb y col., 1981). La eliminación de los intrones de los transcritos virales es llevada a cabo por la maquinaria celular (Lamb y Lai, 1984, 1982), sin embargo la polimerasa viral también está implicada regulando por ejemplo la selección del sitio 5' de *splicing* alternativo del mRNA del segmento M. En ausencia de la polimerasa se genera el mRNA M3 pero en presencia de polimerasa, ésta se une al sitio 5' de *splicing* de M3 y lo enmascara. De este modo la maquinaria celular de *splicing* reconoce un sitio alternativo y se genera un mRNA de M2 (Shih y col., 1995).

4.2.3 Poliadenilación de los mRNAs virales

La elongación de los mRNAs continúa hasta que la polimerasa alcanza la señal de poliadenilación presente en el vRNA, que consiste en una secuencia de 5 a 7 residuos de uridina situada a unos 15 nucleótidos del extremo 5' del vRNA. La polimerasa copia reiteradamente esta secuencia generándose una cola de poli-A (Poon y col., 2000, 1999). Se ha propuesto que el extremo 5' del vRNA permanece unido a la polimerasa en todo el proceso de transcripción (Pritlove y col., 1998). De este modo, el impedimento estérico generado por

la polimerasa al llegar al extremo 5' provocaría la copia reiterada del tramo de uridinas. De acuerdo con esta propuesta, mutaciones en el extremo 5' del vRNA dan lugar a una iniciación de la transcripción eficiente pero los transcritos no son poliadenilados (Poon y col., 1999).

Como resultado de la transcripción, se generan mRNAs virales indistinguibles de los mRNAs celulares, si bien resultan de procesos de *capping* y poliadenilación completamente distintos. Estudios de trans-complementación genética, en los que se ha rescatado el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción, han permitido determinar que la síntesis de mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP (Jorba y col., 2009).

4.3 Traducción de proteínas virales

Los mRNAs virales generados son transportados al citoplasma a través de la membrana nuclear (Shapiro y col., 1987) y traducidos por la maquinaria celular (**Figura I7-5**). Los mRNAs virales se traducen más eficazmente que los mRNAs celulares y además, el virus ejerce una regulación negativa sobre estos últimos, reduciendo drásticamente su traducibilidad (Garfinkel y Katze, 1992; Katze y Krug, 1990; Katze y col., 1989; Yángüez y Nieto, 2011).

La proteína NS1 tiene un papel clave en este efecto actuando a varios niveles: regula la actividad de la polimerasa viral y el procesamiento de los mRNAs virales y celulares, inhibe el corte y poliadenilación de mRNAs celulares, promueve la retención nuclear y la degradación de mRNAs celulares poliadenilados y estimula la traducción de mRNAs virales (Aragón y col., 2000; Chen y Krug, 2000; Falcón y col., 1999, 2004; Fortes y col., 1994; Marión y col., 1997b; Yanguéz y Nieto, 2011). Esta regulación negativa contribuye a un efecto global de inhibición

de síntesis de las proteínas de la célula infectada, un proceso conocido como *shut-off* de proteínas celulares.

4.4 La replicación viral

Las proteínas virales sintetizadas en el citoplasma son transportadas al núcleo y provocan el cambio de la síntesis transcripcional a la síntesis replicativa (**Figura I7-6**). Junto con la síntesis de polimerasa viral, la replicación requiere la síntesis de NP que, además de encapsidar el RNA recién sintetizado (Beaton y Krug, 1984), se cree que aumenta la procesividad de la polimerasa durante la replicación (Honda y col., 1988) y resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación (Beaton y Krug, 1986). Estudios de trans-complementación genética han permitido determinar que la replicación viral se realiza en *trans* por acción de una polimerasa soluble diferente a la residente en la RNP (Jorba y col., 2009).

La iniciación de la replicación tiene lugar en ausencia de cebador y el extremo 5' resultante tiene un trifosfato. Además, la elongación del RNA no se detiene en la señal de poliadenilación sino que continúa hasta el final del molde en un evento denominado anti-terminación (Hay y col., 1982).

La replicación tiene lugar en dos pasos: primero, a partir de las vRNPs paternas (procedentes del virión infectante) se generan las cRNPs que son intermediarios replicativos (**Figura I7-7**), y a partir de las cRNPs se generan vRNPs progenie que serán encapsidadas en los nuevos viriones. La síntesis de vRNPs está controlada temporalmente y gracias a esta regulación se expresan proteínas tempranas (PB1, PB2, PA, NP y NS1) y proteínas tardías (NEP, M1, M2, HA y NA) durante la infección (Smith y Hay, 1982).

4.5 Transcripción secundaria

Las vRNPs generadas tras el proceso de replicación sirven de molde para dar lugar a mRNAs virales durante la transcripción secundaria (**Figura I7-8**). Este proceso es indistinguible mecanísticamente de la transcripción primaria pero el nivel de síntesis de mRNAs es superior ya que la concentración de vRNPs generadas tras los procesos de replicación es muy elevada. En este momento, los procesos de replicación y transcripción secundaria están fuertemente acoplados, mientras que más tarde en la infección se desacoplan para que las vRNPs presentes en el núcleo se dirijan a la formación de nuevos viriones.

4.6 Ensamblaje de los viriones y liberación

En la fase tardía del ciclo, comienza la formación de nuevas partículas virales (**Figura I7-9**). Las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral son transportadas al citoplasma a través del poro nuclear. En este proceso de transporte activo intervienen la proteína M1 (Martin y Helenius, 1991), la proteína NEP y la proteína NP de las vRNPs (Elton y col., 2001; O'Neill y col., 1998). Una vez en el citoplasma las ocho vRNPs que se van a empaquetar en un virus se transportan conjuntamente (Chou y col., 2013) hasta regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Ali y col., 2000; Avalos y col., 1997) a las que previamente se han anclado las proteínas HA, NA y M2 (Nayak y col., 2004; Scheiffele y col., 1999; Simpson-Holley y col., 2002). Estas proteínas tras ser modificadas post-transcripcionalmente son transportadas a vesículas donde el canal iónico M2 aumenta el pH evitando el cambio conformacional que activaría la proteína HA. La encapsidación de las RNPs parece estar dirigida por M1 que es el principal organizador del ensamblaje de nuevos viriones (Gómez-Puertas y col., 1999), aunque también se ha implicado a M2

en este proceso (Iwatsuki-Horimoto *y col.*, 2006; McCown y Pekosz, 2006). El empaquetamiento del genoma viral requiere la incorporación de las 8 vRNPs para generar viriones infectivos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido de las 8 vRNPs que se

seleccionan y organizan siguiendo una distribución de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una central en el interior de la partícula (Debi P. Nayak, Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou y Barman, 2010; Noda *y col.*, 2006). Esta selección podría estar dirigida por secuencias *in cis* presentes

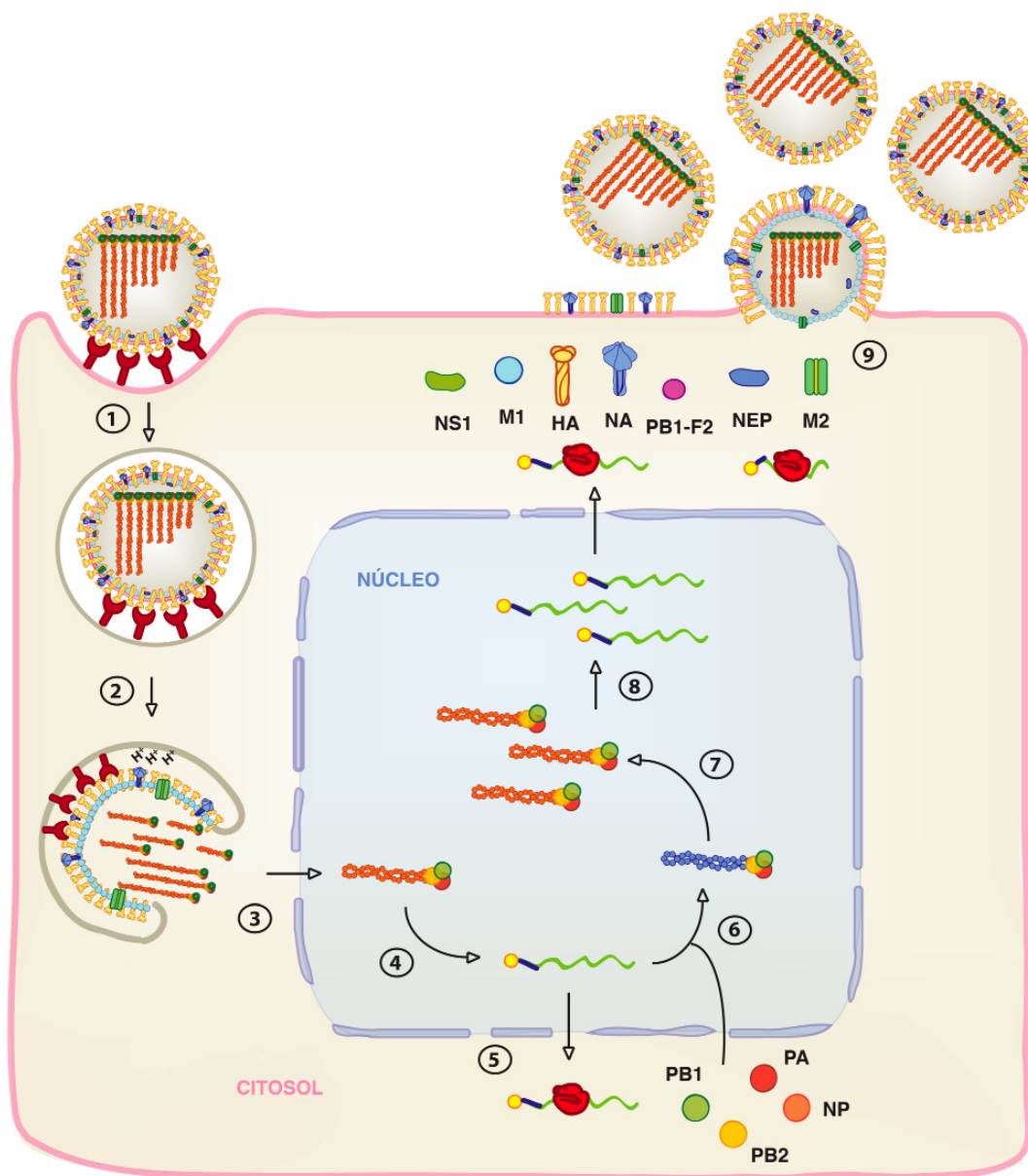


Figura 17. Ciclo de infección viral. Esquema de las etapas de la infección del virus de la gripe. Se representan mRNAs virales (en verde), la maquinaria de traducción celular (en rojo), las cRNPs (en azul) y las vRNPs (en naranja). Los números muestran las fases del ciclo de infección que se indican a continuación: (1) adsorción y entrada del virus, (2) liberación de las RNPs al citoplasma, (3) entrada de las RNPs al núcleo, (4) transcripción primaria, (5) traducción de proteínas virales, (6) transporte de las proteínas virales al núcleo y formación de cRNPs durante la replicación viral, (7) formación de vRNPs, (8) transcripción secundaria y (9) ensamblaje y liberación de viriones. Adaptado de (Jorba, 2009).

en los extremos 5' y 3' de todos los segmentos genómicos (Fujii y col., 2005, 2003; Liang y col., 2005, 2008; Muramoto y col., 2006; Noton y col., 2007; Ozawa y col., 2009; Watanabe y col., 2003). Estudios *in vitro* han mostrado que las RNPs interactúan de manera directa y coordinada por medio de las señales de empaquetamiento del RNA para aumentar la probabilidad de que las 8 RNPs se empaqueten juntas (Fournier y col., 2012a, b; Gavazzi y col., 2013). La liberación de las partículas se produce mediante un fenómeno de gemación o *budding* en la membrana plasmática. Gracias a la acción catalítica de NA, que procesa los receptores de ácido siálico, se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular (Liu y col., 1995; Schulman y Palese, 1977).

Factores celulares implicados en la replicación del RNA viral y en la expresión génica

Como consecuencia de que la información genética contenida en el genoma del virus de la gripe es limitada (sólo en codificar la RNA polimerasa RNA dependiente emplea aproximadamente la mitad de su genoma), éste ha desarrollado numerosas vías para secuestrar factores celulares y utilizarlos en su propio beneficio. El estudio de estas interacciones entre el virus y la célula ha permitido comprender ciertos eventos relacionados con el proceso de infección. Además, la caracterización de la función de los factores celulares en el ciclo infectivo puede ayudar a aclarar o descubrir nuevos aspectos de su función celular. Sin embargo, a pesar de su importancia, los estudios sobre las interacciones entre virus y célula hospedadora van muy por detrás de los estudios sobre proteínas virales. Muchos laboratorios han usado varias aproximaciones para explorar a nivel global las vías celulares importantes para la multiplicación del virus de la gripe. Una de las aproximaciones

más recurrentes han sido los rastreos a gran escala basados en RNAs pequeños interferentes (siRNAs). Hasta la fecha se han llevado a cabo seis rastreos de este tipo (Brass y col., 2009; Hao y col., 2008; Karlas y col., 2010; König y col., 2009; Shapira y col., 2009; Sui y col., 2009) que, en conjunto han permitido identificar 1449 genes humanos (el 5,8 % de los genes codificantes) que potencialmente podrían jugar un papel en la multiplicación del virus de la gripe. Sin embargo, sólo se ha caracterizado la función durante el ciclo infectivo de muy pocos de esos factores, en gran parte debido a la complejidad de los sistemas celulares.

A continuación, se describen aquellas proteínas celulares implicadas en los procesos de replicación y expresión génica viral (**Figura 18**).

1. Proteínas celulares implicadas en el transporte nuclear de proteínas virales

La replicación del RNA viral tiene lugar en el núcleo de la célula infectada (Palese y Shaw, 2007) por tanto, las vRNPs contenidas en la partícula viral han de ser transportadas del citoplasma al núcleo celular. Este transporte se realiza a través del complejo del poro nuclear y debido al gran tamaño de los complejos ribonucleoproteicos (10–15 nm ancho y 30–120 nm largo), el transporte no tiene lugar por difusión pasiva sino que se requieren interacciones específicas con la maquinaria de transporte celular. Aunque todas las proteínas que conforman las RNPs tienen señales de localización nuclear (NLS), se ha descrito que la NLS de NP es la responsable del transporte nuclear de las RNPs (Wu y col., 2007a, b) a través de su interacción con las **importinas $\alpha 1$ y RanBP5 o importina $\alpha 5$** (Cros y col., 2005; O'Neill y col., 1995).

Una vez en el núcleo, las RNPs replican y transcriben el RNA viral. Para que estos procesos tengan lugar

es necesario que las subunidades de la polimerasa se ensamblen y se transloquen al núcleo celular. Se ha propuesto que PB1 y PA, junto con el factor celular RanBP5 forman un complejo en el citoplasma que se transporta al núcleo mientras PB2 se transporta de manera independiente (Deng *y col.*, 2006; Fodor y Smith, 2004). De este modo, una vez en el núcleo se formaría el complejo entre PB1-PA y PB2 tal y como se sugiere en algunos experimentos *in vitro* (Deng *y col.*, 2005). Propuestas alternativas se basan en la formación de dímeros entre la chaperona **HSP90** con PB1 y PB2, y sugieren la formación de los dímeros PB1-PB2 y PB1-PA (Lee *y col.*, 2003) y su transporte conjunto al núcleo (Momose *y col.*, 2002; Naito *y col.*, 2007a).

También se ha demostrado la relevancia para la infección de la **importina β 1** (KPNB1) y de las proteínas del poro nuclear **NUP98** y **NUP153** (Watanabe *y col.*, 2010), aunque es necesaria una caracterización de su función más en profundidad. Probablemente estos factores estén involucrados tanto en el transporte de las vRNPs al interior del núcleo como en el transporte al núcleo de las proteínas virales sintetizadas durante la infección.

2. Proteínas implicadas en la compartimentalización de la síntesis de RNA

Existen evidencias de que hay una asociación funcional y estructural de componentes del virus de la gripe con la cromatina celular. Se ha descrito que las vRNPs, NP libre y M1 interaccionan con los **nucleosomas** (Jackson *y col.*, 1982; López-Turiso *y col.*, 1990). La modificación post-traducciona de las colas de histonas de los nucleosomas es uno de los mecanismos que controlan la organización de la cromatina y permiten clasificarla en transcripcionalmente activa o inactiva dependiendo de la acumulación diferencial de dichas modificaciones. Recientemente se ha demostrado la

asociación de la subunidad de la polimerasa viral PA con el factor remodelador de cromatina **CHD6**. Este factor se relocaliza a zonas de cromatina inactiva durante la infección por lo que se postula que podría participar en el *shut-off* celular inducido por el virus (Alfonso *y col.*, 2011, 2013).

Durante la infección, el nucleolo es el orgánulo nuclear más alterado estructuralmente por el virus (Anisimova, E., Ghendon, Y., Markushin, 1980). Se han identificado 11 proteínas nucleolares asociadas a la polimerasa viral y a las vRNPs, entre las que se encuentra la **nucleofosmina**. Esta proteína se relocaliza del nucleolo al nucleoplasma durante la infección y estimula la actividad de la polimerasa viral en la síntesis de RNA (Mayer *y col.*, 2007).

3. Proteínas celulares implicadas en la síntesis replicativa y expresión génica

El vRNA es transcrito a mRNA y replica vía cRNA (Palese y Shaw, 2007). Las subunidades de la polimerasa viral y NP catalizan estos procesos con la ayuda de algunos factores celulares que estimulan la síntesis del RNA viral y que se describen a continuación.

Se han propuesto funciones similares para las proteínas **BAT1/UAP56** y **TAF-SF1** que interaccionan con moléculas de NP libres y promueven la interacción de NP con el RNA viral (Momose *y col.*, 2001; Naito *y col.*, 2007b) dando lugar a moldes eficientes para la polimerasa viral. Otros factores que estimulan la capacidad de síntesis de la polimerasa son **HSP90** que mediante su interacción con la subunidad PB2 da lugar a una mayor actividad transcripcional *in vitro* (Momose *y col.*, 1996, 2002) y el complejo **MCM** que junto con NP podrían actuar durante la replicación de un modo cooperativo. MCM es un complejo celular con actividad DNA helicasa que interacciona con las RNPs vía PA y estabiliza el

cRNA naciente con el complejo de la polimerasa permitiendo así la síntesis de la copia completa del cRNA (Kawaguchi y Nagata, 2007). Hay muchas evidencias que sugieren que la síntesis de RNA viral está ligada espacial y funcionalmente con la maquinaria de transcripción celular. Se ha descrito la asociación de la polimerasa viral con formas fosforiladas de la RNA polimerasa II celular (**RNAP II**) a través de su extremo C-terminal (CTD) (Chan y col., 2006; Engelhardt y col., 2005). La interacción de la polimerasa viral con la

RNAP II supone el reclutamiento de las RNPs a los complejos de transcripción celular activa donde hay mayor disponibilidad de mRNAs celulares para iniciar los procesos de transcripción viral. Se ha observado que la polimerasa viral promueve la degradación de la RNAP II a tiempos tardíos de la infección (Rodríguez y col., 2007) interrumpiendo así el proceso de elongación de mRNAs celulares (Chan y col., 2006). No se sabe si esta interacción es directa o indirecta, pero se ha descrito que el factor de transcripción celular **CLE/C14orf166** podría

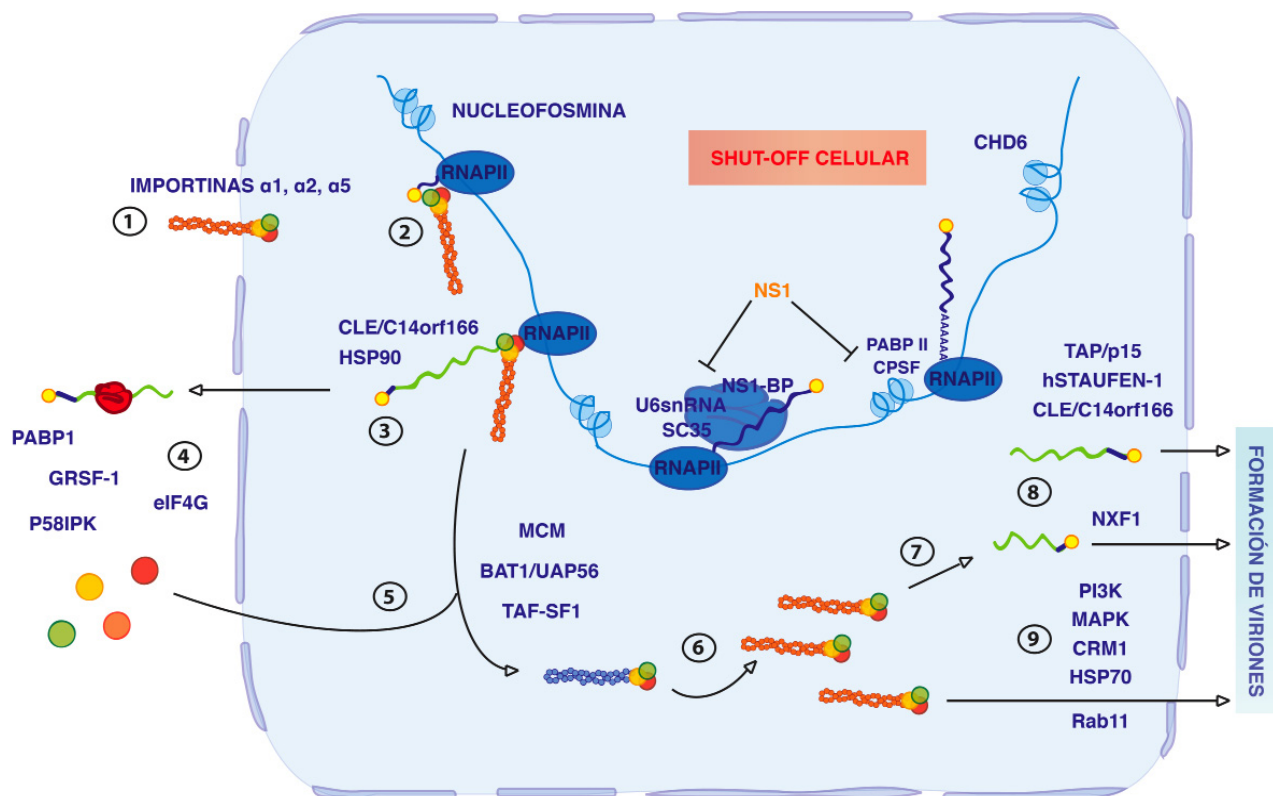


Figura 18. Factores celulares conocidos que participan en la replicación y expresión génica del virus de la gripe.

Se muestran los factores celulares que participan en las fases del ciclo de infección que tienen lugar en el núcleo de una célula infectada: (1) entrada en el núcleo de las RNPs procedentes del virión, (2) reclutamiento de las RNPs a sitios de transcripción celular activa y (3) transcripción primaria, (4) traducción de proteínas virales, (5) formación de cRNPs durante la replicación viral, (6) formación de vRNPs, (7) transcripción secundaria, (8) transporte de mRNAs virales sin procesar y procesados por *splicing* y (9) transporte de vRNPs al citoplasma para la formación de viriones. Se indica además la inhibición del *splicing* y de la poliadenilación de los pre-mRNAs celulares mediada por NS1 y el reclutamiento del factor CHD6 a sitios de cromatina transcripcionalmente inactiva, que son procesos que contribuyen al *shut-off* celular.

ejercer de proteína puente ya que interacciona con las dos polimerasas y es un modulador positivo de la actividad de la RNAP II (Huarte *y col.*, 2001; Perez-Gonzalez *y col.*, 2006). Además se ha descrito que la proteína NS1 a través de su interacción con **CPSF** y **PABPII** impide el corte y poliadenilación de mRNAs celulares (Chen *y col.*, 1999; Nemeroff *y col.*, 1998) lo que contribuiría fuertemente al *shut off* celular.

4. Proteínas celulares implicadas en *splicing* de mRNAs virales

Durante la infección viral el patrón estructural de **SC35** que se localiza en *speckles* junto al resto de factores implicados en *splicing*, se desorganiza y adquiere un patrón más difuso (Fortes *y col.*, 1995). La proteína viral responsable de este fenómeno es NS1 y, de acuerdo con estos datos, se ha identificado NS1 asociada a varios factores de *splicing* como **NS1-BP** (Wolff *y col.*, 1998) y **U6 snRNA**, cuya interacción inhibe los procesos de *splicing* de pre-mRNAs celulares (Qiu *y col.*, 1995a).

5. Proteínas celulares implicadas en el transporte de mRNAs virales

Los mRNAs virales deben ser exportados al citoplasma para su traducción. Se ha observado que la salida de los mRNAs virales no es sensible a leptomomicina B y es por tanto, un proceso independiente de la vía CRM1. Sin embargo, la proteína NS1 interacciona con los elementos **TAP/p15** y ambas copurifican con los mRNAs virales (Wang *y col.*, 2008). Por tanto, se cree que los mRNAs virales se exportan por la vía TAP/p15 con la participación de NS1 y la RNAP II (Amorim *y col.*, 2007).

La proteína **NXF1** exporta mRNAs celulares que han sido procesados mediante *splicing* pero no

aquellos que no han sido procesados (Reed y Cheng, 2005). En el caso de gripe, como se ha comentado anteriormente, NP interacciona con BAT1/UAP56 que forman un puente entre los mRNAs que han sido procesados por *splicing* y el complejo NXF1-NXT1. Además NS1 se une a NXF1 para inhibir el transporte de los mRNAs celulares del núcleo al citoplasma (Satterly *y col.*, 2007) y permitir el transporte de los mRNAs virales (Read y Digard, 2010). Así el virus de la gripe utiliza la vía de transporte NXF1 para múltiples propósitos.

La proteína **hStaufen-1** se asocia a NS1 (Falcón *y col.*, 1999), a la polimerasa viral y a las vRNPs (De Lucas *y col.*, 2010). La proteína **CLE/C14orf166** comentada anteriormente, además de ser un factor de transcripción celular se ha encontrado formando parte de complejos que contienen mRNA viral junto con hStaufen-1 (Elvira *y col.*, 2006; Kanai *y col.*, 2004; Perez-Gonzalez *y col.*, 2006; Villacé *y col.*, 2004) por lo que se postula que ambas proteínas podrían ejercer una función en el transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma.

6. Proteínas celulares implicadas en la traducción viral

Los mRNAs virales se traducen preferentemente frente a los celulares (Chen y Krug, 2000; Chen *y col.*, 1999; Fortes *y col.*, 1994; Nemeroff *y col.*, 1998; Qiu y Krug, 1994). Se han descrito unas secuencias en *cis*, comunes en el extremo 5' de todos los mRNAs virales que les permiten tener una mayor traducibilidad (Garfinkel y Katze, 1993) aunque también se han implicado algunas proteínas como **GRSF-1** y **P58IPK** en la síntesis selectiva de las proteínas virales (Goodman *y col.*, 2007; Kash *y col.*, 2002; Park *y col.*, 1999).

La proteína NS1 interacciona con los factores **eIF4G** (Aragón *y col.*, 2000) y **PABP1** (Burgui y

col., 2003), une el extremo 5' de los RNAs virales (Park y Katze, 1995) y se localiza en polisomas favoreciendo la incorporación de ribosomas a los mRNAs virales (De la Luna y *col.*, 1995). También se ha descrito que la polimerasa viral se une al complejo de iniciación de la traducción celular (Burgui y *col.*, 2007) con independencia del factor eIF4E (Yanguéz y *col.*, 2012) y a varias proteínas ribosomales (Mayer y *col.*, 2007). Este conjunto de interacciones permiten la circularización de los mRNAs virales lo que favorece la reiniciación de su traducción.

7. Proteínas celulares importantes para la salida de las RNPs del núcleo

Las vRNPs recién sintetizadas han de ser eficazmente exportadas del núcleo (Boulo y *col.*, 2007) y dirigidas a zonas de formación de viriones. En este proceso se ha descrito que las proteínas M1 y NEP tienen papeles importantes. Una vez que M1 se ha unido a la RNP, NEP se une al complejo a través de su extremo C-terminal (Akarsu y *col.*, 2003). NEP también se une a la proteína de transporte **CRM1** (Boulo y *col.*, 2007; Elton y *col.*, 2001; Neumann y *col.*, 2000). La proteína **HSP70** y la cascada de las **MAP kinasas** también podrían tener un papel en el transporte de las vRNPs al citoplasma (Pleschka y *col.*, 2001a; Watanabe y *col.*, 2006). Además se ha demostrado que un inhibidor de **PI3K** bloquea el transporte de las vRNPs así como la síntesis de RNA viral (Shin y *col.*, 2007).

Una vez en el citoplasma, las 8 vRNPs que contienen los segmentos virales que se van a empaquetar se asocian en complejos macromoleculares. Esta asociación es facilitada por la proteína endosómica **Rab11** (Chou y *col.*, 2013). Las vRNPs han de dirigirse a la membrana celular donde tienen lugar los procesos de morfogénesis viral, para ello interactúan con componentes del citoesqueleto.

En concreto NP se asocia a los filamentos de **actina** (Digard y *col.*, 1999) lo que permite que las vRNPs sean dirigidas a las zonas de *budding* en la membrana plasmática. La proteína **Rab11** también se ha visto implicada en el transporte de las RNPs a la membrana plasmática (Momose y *col.*, 2011).

8. Factores celulares que interactúan con la polimerasa viral *in vivo*

Además de los factores celulares citados anteriormente, es necesario identificar nuevas vías celulares que la polimerasa viral utilice para llevar a cabo la replicación y la expresión génica viral. Los primeros estudios que buscaron proteínas celulares que interactuaran con proteínas del virus de la gripe, utilizaron técnicas de doble híbrido en levaduras, ensayos de fraccionamiento bioquímico y complementación *in vitro*. En el laboratorio se realizó un estudio más genérico que permitió la identificación de factores celulares asociados a la polimerasa viral *in vivo* (Jorba y *col.*, 2008). Para ello, se purificaron los complejos de polimerasa marcada con una etiqueta TAP mediante un doble paso de cromatografía (Rigaut y *col.*, 1999) y se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF 10 proteínas asociadas. A continuación, se analizó la relevancia de las proteínas seleccionadas durante la infección mediante silenciamiento génico. De las proteínas estudiadas, el silenciamiento del factor SFPQ/PSF fue el que tuvo mayor impacto en la infección viral. Teniendo en cuenta estos antecedentes, durante esta Tesis Doctoral se decidió caracterizar la función de la proteína SFPQ/PSF durante el ciclo infectivo del virus de la gripe.

Localización y función celular de SFPQ/PSF

SFPQ/PSF es una proteína de 100 kDa que pertenece a la familia DHBS (*Drosophila behavior/human splicing*). Otros miembros destacados de esta

familia son p54nrb/NonO y PSPC1. Estas proteínas se caracterizan por tener una alta homología en la secuencia del extremo C-terminal (Fox y col., 2005). En este extremo además de tener señales de localización nuclear (NLS) poseen un dominio llamado NOPS que es importante para la dimerización entre miembros de la familia DHBS ya sea para formar homodímeros o heterodímeros, y un dominio llamado COIL importante para la localización de estas proteínas dentro del núcleo (**Figura 19**) (Passon y col., 2012). En la región central SFPQ/PSF contiene dos dominios consecutivos de unión a RNA (RRM) que también presentan homología de secuencia con p54nrb/NonO y PSPC1. SFPQ/PSF presenta un extremo N-terminal muy característico que contiene regiones muy ricas en los aminoácidos prolina, glutamina, arginina y glicina que se han involucrado en interacciones proteína-proteína (Patton y col., 1993).

Las proteínas SFPQ/PSF, p54nrb/NonO y PSPC1 forman el *core* de los *paraspeckles* aunque mediante estudios de inmunofluorescencia también se ha localizado a SFPQ/PSF en otras regiones del núcleo, como en el nucleoplasma y en el nucleolo presentando un patrón tanto punteado como difuso (Shav-Tal y col., 2001a, b).

A SFPQ/PSF se le han atribuido múltiples funciones en distintos pasos de la expresión génica celular (Shav-Tal Y, 2002). La primera función que se le asignó fue el *splicing* de pre-mRNAs celulares. Se identificó como un factor del *spliceosoma* (Bennett y col., 1992) y se ha demostrado que es esencial para el *splicing in vitro* (Patton y col., 1993). En concreto se sabe que participa en el segundo paso catalítico del *splicing* y que controla el *splicing* alternativo (Melton y col., 2007; Rosonina y col., 2005). En línea con estas funciones propuestas, se ha descrito que SFPQ/PSF interacciona con distintos componentes de la maquinaria de *splicing* como PTB (Lutz y col., 1998) y U4/U6-U5 snRNP entre otros (Gozani y col., 1994; Peng y col., 2002, 2006). Como se ha comentado anteriormente SFPQ/PSF forma heterodímeros con p54nrb/NonO. Hay múltiples estudios que caracterizan el papel del heterodímero SFPQ/PSF-p54nrb/NonO en la regulación de la transcripción celular (Shav-Tal y Zipori, 2002) y además se ha demostrado que ambas proteínas interaccionan con el CTD de la RNAP II (Emili y col., 2002). Otra de las funciones que se le asignan al heterodímero es la retención específica en la matriz nuclear de RNA hipereditado (Shav-Tal y Zipori, 2002; Zhang y Carmichael, 2001). Este mecanismo se propone como la forma que tiene la

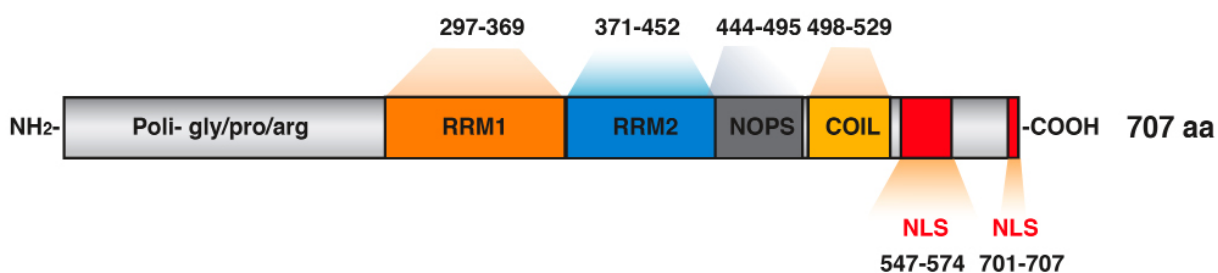


Figura 19. Dominios de SFPQ/PSF. Se representan los dominios de la proteína SFPQ/PSF que incluyen regiones de unión a RNA (RRM1 y RRM2), el dominio de dimerización con proteínas de la familia DHBS (NOPS) y el dominio de interacción con otras proteínas (COIL). Se indican las señales de localización nuclear (NLS) y el dominio rico en los aminoácidos glicina (gly), prolina (pro) y arginina (arg). En los aminoácidos del 9 al 11, del 19 al 21 y del 25 al 27 hay repeticiones de la secuencia aminoacídica arg-gly-gly. También se encuentran regiones de poli-gly (10-15, 20-27, 613-616, 635-641), de poli-pro (56-65, 99-103, 184-188) y de poli-arg (571-574). Adaptado de (Dye & Patton, 2001; Patton, Porro, Galceran, Tempst, & Nadal-Ginard, 1993) y *Swiss prot*.

célula de no permitir la traducción de aquellos mRNAs que darán lugar a proteínas mutadas.

Cabe destacar que SFPQ/PSF desempeña distintas funciones en ciclos infectivos de otros virus RNA ya que interacciona con el RNA del virus de la Hepatitis δ (Greco-Stewart *y col.*, 2006) y con el extremo 3' del RNA del virus de la Hepatitis C (Harris *y col.*, 2006). Además, durante el ciclo infectivo de VIH inhibe el transporte de mRNAs virales que contienen secuencias reguladoras llamadas INS que afectan a la estabilidad del mRNA, al transporte del núcleo al citoplasma y a su traducción (Zolotukhin *y col.*, 2003).

Las diferentes funciones nucleares en las que está implicada SFPQ/PSF y su interacción con la polimerasa viral, hacen del estudio de esta proteína un tema clave para profundizar en los mecanismos de interacción entre el virus de la gripe y la célula infectada, que es lo que hemos pretendido abordar en la realización de esta Tesis Doctoral.

Terapia antigripal

1. Enfermedad de gripe y antivirales disponibles

La infección por gripe afecta a la población en general causando síntomas severos entre los que se incluyen fiebre alta, dolor de cabeza, postración y dolor muscular. Además, puede provocar que el individuo infectado sea más susceptible a infecciones virales o bacterianas del tracto respiratorio inferior ocasionando neumonía. En individuos que conforman población de riesgo (mayores de 65 años o menores de 2 años, mujeres embarazadas, personas con obesidad...) la infección por gripe puede resultar fatal, provocando septicemia y fallo multiorgánico.

Para combatir al virus, actualmente se dispone

de cuatro tipos de antivirales clasificados en adamantanos (*Amantadina* y la *Rimantadina*) que son inhibidores de la proteína M2 y los inhibidores de la NA (*Oseltamivir* y *Zanamivir*).

Los **adamantanos** bloquean la actividad canal iónico de la proteína M2 (Pinto y Lamb, 2007) pero prácticamente están en desuso en clínica debido a que las cepas circulantes de *Influenzavirus A* (H1N1 incluyendo la cepa causante de la pandemia del 2009 y H3N2) han sustituido el aminoácido serina por asparragina en la posición 31 de la proteína M2 y se han hecho resistentes (Bright *y col.*, 2005, 2006). Además estos antivirales no son efectivos contra *Influenzavirus B*.

Los **inhibidores de la NA** son análogos de ácido siálico, por lo que su mecanismo de acción consiste en bloquear el sitio activo de la NA (McKimm-Breschkin, 2013). De los inhibidores de la NA, el más utilizado es el *Oseltamivir* ya que su administración es oral y se ha probado su eficacia en niños de 1 a 6 años. Se ha descrito un aumento en la aparición de virus resistentes al *Oseltamivir* en los años 2007 y 2008 (Meijer *y col.*, 2009). Estos hechos hacen que sea esencial el desarrollo de nuevos antivirales.

2. Antivirales en fases de desarrollo clínico

La investigación actual propone varias estrategias para controlar la infección por gripe que consisten en (i) mejorar el diseño, la potencia y la vía de administración de los antivirales disponibles, (ii) identificar nuevos compuestos que bloqueen proteínas virales, (iii) bloquear factores celulares importantes para llevar a cabo el ciclo infectivo, (iv) modular la respuesta inmune del hospedador para minimizar el daño de tejido producido por la infección y (v) la terapia combinada de varios antivirales, que se propone como la mejor forma de minimizar la aparición de virus resistentes.

En la actualidad hay muchos compuestos candidatos a antigripal sujetos a estudio. A continuación se nombran aquellos que están en fases de desarrollo clínico en humanos:

De los antivirales en desarrollo cuya diana es una proteína viral el más prometedor es el **Favipiravir** (T-705). Este compuesto fue identificado en 2002 y actualmente se encuentra en fase III de desarrollo clínico en humanos. Es un análogo de nucleósido que inhibe la polimerasa de los géneros *Influenzavirus A*, *B* y *C* (Furuta *y col.*, 2013). Se ha demostrado que este compuesto inhibe la incorporación de nucleótidos a la hebra de RNA viral naciente (Furuta *y col.*, 2005) y además se propone que induce mutagénesis letal durante la infección por gripe (Baranovich *y col.*, 2013).

Además de bloquear proteínas virales, el concepto de bloquear vías celulares importantes para llevar a cabo el ciclo viral cada vez va cobrando más peso. La ventaja de bloquear vías celulares importantes para el virus es que el efecto inhibitorio en principio no será específico de cepa gripal y que se minimizará la aparición de virus resistentes.

DAS181 es una sialidasa de la bacteria *Actinomyces viscosus*, que elimina el ácido siálico de las células epiteliales bloqueando la interacción con la HA y evitando así la entrada del virus de la gripe a las células epiteliales. Esta sialidasa se ha probado en 297 pacientes en los que se observó una disminución drástica de la propagación viral (Moss *y col.*, 2012).

Además de inhibir la entrada del virus, se han generado compuestos que bloquean vías celulares que se activan fuertemente durante la infección por el virus de la gripe como la vía de las kinasas **MAPK/ERK** (Pleschka *y col.*, 2001b). Inhibidores específicos de esta vía dan lugar a la retención en el

núcleo de las RNPs virales ya que bloquean el factor de exportación nuclear NEP. Estos compuestos se encuentran actualmente en fase I de desarrollo en humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los virus de la gripe tipo A causan epidemias anuales de infecciones respiratorias y en intervalos de tiempo variables dan lugar a grandes pandemias. Para combatir la enfermedad se dispone en la actualidad de cuatro antivirales, pero el virus ha desarrollado resistencias a gran parte de ellos como consecuencia de su alta capacidad de variación genética.

Los virus de la gripe contienen una información genética limitada y requieren factores de la célula hospedadora para llevar a cabo cada una de las etapas de su ciclo infectivo. Recientemente se ha propuesto usar estos factores celulares como dianas antivirales y así minimizar la aparición de virus resistentes.

Por tanto, el Objetivo general de esta Tesis ha sido el **estudio de los factores celulares usados por el virus de la gripe** para llevar a cabo su ciclo infectivo. Para ello se han utilizado dos estrategias experimentales: la primera permitió la caracterización funcional de factores celulares previamente identificados como asociados a la polimerasa viral *in vivo* mediante un análisis proteómico. De forma complementaria se realizó un abordaje funcional mediante el rastreo de compuestos químicos que fueran capaces de bloquear vías celulares importantes para llevar a cabo los procesos de replicación y/o expresión génica del virus de la gripe.

En este contexto, se propusieron los siguientes Objetivos concretos:

- 1. Caracterización de la función de uno de los factores celulares asociados a la polimerasa viral (SFPQ/PSF) durante la infección por el virus de la gripe.**
- 2. Identificación de compuestos previamente usados en clínica que sean capaces de inhibir la replicación y/o expresión génica del virus de la gripe.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1. Líneas celulares eucariotas

-A549: células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard *y col.*, 1973) cedida por J. A. Melero.

-HEK293T: células embrionarias de riñón humano (Graham *y col.*, 1977) cedidas por T. Zürcher y J.C. de la Torre.

-MDCK: células de riñón de perro (Madin y Darby, 1958) cedidas por T. Zürcher y obtenidas de la ATCC.

-3T3: fibroblastos de origen embrionario de ratón (Todaro y Green, 1963) cedidos por R. Alfonso.

-Huh-7: hepatocitos derivados de carcinoma de hígado humano (Sainz *y col.*, 2009) cedidos por P. Gastaminza.

-BHK-21: fibroblastos de riñón de hámster Sirio o dorado (*Mesocricetus auratus*) cedidos por F. J. Rodríguez.

-LCC-MK2: células epiteliales de riñón de mono *Rhesus* (*Macaca mulatta*) (Hull *y col.*, 1962) cedidas por P. Gastaminza.

2. Cepas bacterianas

-E. Coli DH5 α [genotipo *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]: cepa utilizada para la amplificación de todos los plásmidos.*

3. Cepas virales

-A/Victoria/3/75 (H3N2) (Vic): cepa de gripe

humana de campo obtenida del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología.

-A/recVictoria/3/75 (H3N2) (rVic): virus recombinante derivado de la cepa A/Victoria/3/75 con los genes HA, NA y M de la cepa A/WSN/33 rescatado por A. M. Falcón (Falcón *y col.*, 2005).

-A/WSN/33 (H1N1) (WSN): virus de gripe adaptado a crecer en cerebro de ratón cedido por G. Brownlee.

-A/California/07/09 (H1N1) (Calif): virus de la gripe causante de una pandemia en 2009 cedido por A. Rodríguez.

-Virus de la estomatitis vesicular (VSV): virus de la estomatitis vesicular cedido por R. Alfonso.

-Adenovirus 5 (Ad5): adenovirus tipo 5 cedido por P. Fortes.

4. Plásmidos

-pCMVPB1, pCMVPA, pCMVPB2, pCMVNP: plásmidos que contienen los cDNA de las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa A/Victoria/3/75 bajo el promotor CMV dependiente de la RNA polimerasa II celular. Fueron contruidos y cedidos por J. Ortega (Falcón *y col.*, 2004; Mena *y col.*, 1996).

-pCMVPB2HIS: plásmido que contiene el cDNA de la subunidad PB2 de la polimerasa viral con una etiqueta de seis histidinas. Fue clonado y cedido por R. Coloma (Guilligay *y col.*, 2008).

-pHH21: plásmido que contiene el promotor de la RNA polimerasa I humana y el terminador de la RNA polimerasa I de ratón separados por sitios *BsmBI*. Este plásmido fue cedido por G. Hobom

(Neumann y col., 1999).

-pHHclon23: plásmido que codifica un vRNA de 248 nucleótidos bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Fue cedido por R. Coloma (Ortega y col., 2000).

-pHHCAT: plásmido que codifica el vRNA del gen de la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) en polaridad negativa con los extremos conservados del segmento NS, bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Fue construido y cedido por A. Rodríguez.

-pHHM, pHHNP y pHHNS: plásmidos derivados del pHH21 que codifican el vRNA del gen M, NP y NS respectivamente de la cepa A/Victoria/3/75. Fueron construidos y cedidos por A. M. Falcón y Y. Fernández (Falcón y col., 2004).

-pSVa982, pGEMpoliANP y p232N: plásmidos que contienen la secuencia del mRNA de los genes M, NP y NS respectivamente de la cepa A/Victoria/3/75 (Fortes y col., 1994).

-pCAGGS-EGFP: plásmido que contiene el cDNA de EGFP bajo el promotor de la β -actina de pollo. Este plásmido fue obtenido de *Addgene* (11160).

-Los plásmidos **pcDNA3-SFPQ/PSF-FLAG** y **pHH21-EGFP**, se obtuvieron a lo largo de esta Tesis y su construcción se describe en el apartado 1 de Métodos.

5. Anticuerpos

-Inmunoglobulinas de ratón: purificadas de suero, fueron obtenidas de *Abcam* (ab37355).

Los anticuerpos primarios usados fueron:

-NP: suero policlonal generado por inmunización de conejos con la proteína NP, generado y cedido por N. Zamarreño.

- β -actina: anticuerpo monoclonal de ratón obtenido de *Sigma* (ab8226).

-SFPQ/PSF: anticuerpo monoclonal adquirido de *Abcam* (ab11825).

-p54nrb/NonO: anticuerpo policlonal adquirido de *Abcam* (ab45359).

-Anti-Ad5: anticuerpo monoclonal adquirido de *Chemicon* (MAB805).

Los anticuerpos secundarios utilizados para *Western-blot* fueron:

-Cabra anti ratón unido a peroxidasa de rábano fue adquirido de *Southern Biotechnology Associates* (1030-05).

-Cabra anti conejo unido a peroxidasa de rábano fue adquirido de *Sigma* (A0545).

Los anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia se obtuvieron de *Invitrogen* y fueron:

-Cabra anti conejo unidos al fluoróforo Alexa 488.

-Cabra anti ratón unidos al fluoróforo Alexa 594.

6. Silenciadores (siRNAs)

Todos los siRNAs utilizados fueron diseñados por *Ambion* y su secuencia y número de referencia aparecen especificadas en la **Tabla M1**.

Tabla M1. Secuencia de siRNAs

Nombre	Referencia	Secuencia (5'→3')
siCTRL	AM4611	No facilitada por la casa comercial
siSFPQ1	107613	dir GGCAUUUGAACGAUGCAGUtt rev ACUGCAUCGUUCAAUGCCtt
siSFPQ2	15923	dir GGAGAAGUUUUUAUCAACAtt rev UGUUGAUAAAAACUUCUCtg
siNonO1	s9614	dir GGCUUGACUUAUUGACCUGAtt rev UCAGGUCAAUAGUCAAGCCtt
siNonO2	s9612	dir CCAGCAAUUUCACAAGGAAtt rev UUCCUUGUGAAAUUGCUGGtt

Los siRNAs se reconstituyeron en H₂O a una concentración de 100 µM y se almacenaron a -80°C. Se prepararon diluciones de trabajo a 20 µM, que se almacenaron a -20°C.

7. Compuestos químicos

-Las **quimiotecas** se obtuvieron del NIH (*NIH clinical collection* NCC-104 y NCC-201). Los compuestos fueron proporcionados ya reconstituidos en DMSO a una concentración de 10 mM.

-El **compuesto C9** fue adquirido de *AKOS GmbH* (AKOS015833416). Se reconstituyó en DMSO a una concentración de 10 mM y se almacenó en porciones a -80°C. La composición de este compuesto fue verificada por espectrometría de masas.

-El **compuesto T-705** (Favipiravir) fue adquirido de *AKOS GmbH* (AKOS005166863). Se reconstituyó en DMSO a una concentración de 10 mM y se almacenó en porciones a -80°C.

Métodos

1. Manipulación de DNA y clonajes

1.1 Clonaje del plásmido pHH21-EGFP

Se partió del plásmido pPOLHUMANI-EGFP del que se amplificó el ORF del gen egfp flanqueado por las secuencias conservadas del segmento NS de gripe mediante PCR usando el *kit* de *Expand Long Template* (Roche) y los oligonucleótidos GTC AAT CAC GTC TCT TAT TAG AGA AAC AAG GGT GTT TT y CAG TAT CAC GTC TCT GGG AGC AAA AGC AGG GTG ACA AAG. Estos oligonucleótidos contienen además de parte de la secuencia conservada del segmento NS de gripe, la diana de la enzima *BsmBI*. Se digirió el producto de PCR y el plásmido pHH21 con la enzima *BsmBI* y se purificaron los productos con las columnas *MicroSpin™* S-300 (GE Healthcare 27513001). Posteriormente se procedió a su ligación. Las condiciones de restricción y aislamiento del DNA, así como las de ligación y transformación en células

E.coli DH5 α , han sido descritas previamente (Sambrook Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989).

1.2 Clonaje del plásmido pcDNA3-SFPQ/PSF-FLAG

Se partió del plásmido comercial pCMV6-XL6 (*Origene*) y se amplificó el ORF del gen sfpq/psf mediante PCR usando el *kit* de *Expand Long Template* (*Roche*) y los oligonucleótidos GAC CAC TGG TAC CAT GTC TCG GGA TCG GTT CCG GAG y GCA CTG TCA CTC GAG CTA AAA TCG GGG TTT TTT GTT TGG GC. Estos oligonucleótidos contienen además de secuencias específicas del gen sfpq/psf, las dianas de restricción de *KpnI* y *XhoI* respectivamente. Se digirió el producto de PCR y el plásmido pcDNA3 con las enzimas *KpnI* y *XhoI* y se purificaron los productos con las columnas *MicroSpin™* S-300 (*GE Healthcare* 27513001). Posteriormente se procedió a su ligación. Las condiciones de restricción y aislamiento del DNA, así como las de ligación y transformación en células E.coli DH5 α , han sido descritas previamente (Sambrook Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989). Para añadir la etiqueta FLAG al C-terminal del gen sfpq/psf se utilizó el *kit* comercial de mutagénesis dirigida *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene* 200518) según las indicaciones del fabricante. Para las PCR se usaron los oligonucleótidos siguientes AAC AAA AAA CCC CGA TTT GAT TAT AAG GAT GAC GAT AAG TAG CTC GAG CAT GCA TCT y AGA TGC ATG CTC GAG CTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT ATA ATC AAA TCG GGG TTT TTT GTT. Estos oligonucleótidos contienen una parte de la región C-terminal de SFPQ/PSF y la secuencia de la etiqueta FLAG. Una vez generado el plásmido se secuenció usando los oligonucleótidos externos de SP6 (GAT TTA GGT GAC ACT ATA G) y T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG).

2. Análisis de RNAs

2.1 Aislamiento de RNA total de la célula

El RNA total celular se extrajo usando el reactivo TRIzol (*Ambion* 15596018) siguiendo en todo momento las indicaciones del fabricante. Brevemente, se añadió 1 ml de TRIzol por cada $1 \cdot 10^6$ de células directamente sobre la placa de cultivo. Tras 5 minutos de incubación a TA, se trasvasó el volumen de TRIzol a un tubo y se añadieron 200 μ l de cloroformo. Se agitó el tubo con el vortex durante 15 segundos y se incubó 2 minutos a TA. Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 12000 rpm y 4°C para permitir la separación en fases de la muestra. La fase acuosa, en la que presumiblemente se encuentra el RNA, se trasvasó a otro tubo. Una vez extraído el RNA se procedió a su precipitación, para ello se añadieron 500 μ l de isopropanol al 100 % sobre la fase acuosa y se incubó la mezcla durante 10 minutos a TA. A continuación se centrifugó la muestra 10 minutos a 12000 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante invirtiendo el tubo y se procedió a lavar el RNA contenido en el sedimento. Para ello, se añadió 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó la muestra 5 minutos a 7500 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante por inversión y se incubó la muestra a TA con la tapa abierta para permitir la evaporación del etanol. Finalmente, el RNA purificado se resuspendió en agua libre de nucleasas y la absorbancia fue medida a 260 nm en el *NanoDrop ND-1000*.

2.2 Purificación de mRNA por cromatografía de oligo-dT-celulosa

La purificación de mRNA de la célula se realizó mediante cromatografía de afinidad a una resina de oligo-dT celulosa (*Sigma* O3131). Las muestras de RNA total obtenidas previamente y resuspendidas en H₂O DEPC se llevaron hasta 0.5 % sarcosil y se

incubaron a 100°C durante 3 minutos. A continuación se llevaron a un tampón con concentraciones finales de 0.5 M ClNa, 0.5 % sarcosil y 10 mM Tris HCl pH 7.5. Tras equilibrar la resina en el mismo tampón se aplicó la muestra, se incubó 1 minuto a 4°C y se centrifugó 1 minuto a 1500 rpm. Lo que no quedó retenido en este primer paso se volvió a aplicar a la resina y al segundo sobrenadante se le denominó fracción poli A⁻. Tras varios lavados con el tampón de unión, se eluyó el mRNA en dos pasos: primero se aplicó 1 % sarcosil y tras su incubación y centrifugación se añadió un volumen equivalente de H₂O DEPC. Dichas eluciones se mezclaron y se las denominó fracción poli A⁺.

2.3 Detección y cuantificación del RNA

2.3.1 Hibridación *Dot-Blot*

Los RNAs purificados como se ha descrito en el apartado 2.1 de Métodos se mezclaron con un tampón desnaturante que contenía 10x SSC y 7.5 % formaldehído (*Sigma* F8775), preparado en H₂O DEPC. Una vez hervidas las muestras, se aplicaron en un filtro de nylon (*Pall Corporation* 60106-0.45 µM) donde quedaron fijadas usando un aparato de *dot* (*Gibco*) y se hibridaron usando sondas específicas para cada caso (**Tabla M2**). El proceso de marcaje de las sondas se describe en el apartado de Métodos 2.3.1.1. Para la hibridación, se incubó el filtro en un tampón de prehibridación (6x SSC, 0.5 % SdS, 5x Denhardt's, 40 % Formamida desionizada (*Sigma*) y 100 µg/ml DNA de esperma de salmón en H₂O DEPC) a 37°C durante al menos 2 horas. Posteriormente se desnaturizó la sonda manteniéndola a 100°C durante 3 minutos y se añadió sobre el tampón de prehibridación. La incubación se mantuvo durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se recuperó la sonda no hibridada y se realizaron lavados usando diferentes tampones según cada hibridación. En todas las hibridaciones

se comenzó haciendo lavados de 30 minutos a 37°C con un tampón que contenía 6x SSC y 0.5 % SdS en H₂O DEPC. Tras realizar exposiciones con pantallas de *phosphoimager* se evaluó la necesidad de seguir realizando lavados dependiendo de la relación señal/ruido. En los casos en los que se necesitó realizar lavados más estrictos se utilizaron tampones con una menor concentración de sales. En todo el proceso de lavados entre uno y otro se monitorizó la relación señal/ruido realizando exposiciones con pantallas de *phosphoimager*. Se analizó el resultado mediante la exposición de las pantallas a la membrana y la radiactividad se detectó mediante el *phosphoimager* y se cuantificó usando el programa *ImageQuant*.

2.3.1.1 Marcaje de sondas para la detección de RNAs

Se diseñaron oligonucleótidos sintéticos específicos de las distintas especies de RNA (mRNA, cRNA y vRNA) de distintos segmentos (gen M, gen NP, gen NS o gen *cat*), cuya secuencia se muestra en la **Tabla M2**. El extremo 5'OH de los oligonucleótidos fue marcado con la polinucleótido kinasa T4 (*New England Biolab*) durante 30 minutos a 37°C en el tampón comercial suministrado por el fabricante suplementado con 1 mM DTT, 1 U/µl HPRI y 20 µCi de γ³²P-ATP (400 Ci/mmol).

2.3.1.2 Obtención de ribosondas para la detección de cRNA de los segmentos virales M, NP y NS

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* de ribosondas marcadas radiactivamente se generaron moldes mediante la hibridación de dos oligonucleótidos cuya secuencia era complementaria y que contenía el promotor de la RNA polimerasa T3. Para generar los moldes se incubaron 19 pmoles de cada uno de los oligos a 95°C durante 5 minutos. A continuación se incubaron 10 minutos a TA. De esta mezcla se tomaron 300 ng que conformarán el

Tabla M2. Secuencia de oligonucleótidos específicos

Tipo de RNA	Seg. diana	Secuencia 5'→3'	Long. (nt)	Formamida (%)
vRNA	M	AGAATAGACACACGGAATGTACAA GATGTGCACCTCTCTCCGTTGGTGT	30	41.1
	NP	AAAGAGCACCATGTAGAAGAATAG GTAGATTTCGCATTACACGATCGAGG TCTCG	30	47.4
	NS	AGGACTTGAATGGAATGATAACAC AGTTCGA	31	39.4
mRNA	M	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACT CCAGTTCAATG	36	30.4
	NP	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTT AATTGTCGTAC	34	28.7
	NS	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATC ATTAAATAAGCT	37	25.6
vRNA	CAT	CCGTTGATACATCCCAATCGCATCG TAAAG	30	43.24
		AAGACCGTAAAGAAAAATAAGCAC AAGTTT	30	32.76
		TTTCACCAGTTTTGATTTAAACGT GGCCAA	30	36.93
mRNA y cRNA	CAT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGA TCTATTACGCCCCG	38	37.7
mRNA-poliU	CAT	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAG ATCTATTACGCCCCG	38	37.7
rRNA	5S	TCCCAGGCGGTCTCCCATCC	20	43.8

molde de la reacción de transcripción. La secuencia de las ribosondas resultantes de la transcripción se especifica en la **Tabla M3**. Todas las reacciones de transcripción *in vitro* se realizaron a 37°C durante 3 horas en un tampón de transcripción comercial (HB101 *Roche*). La mezcla de reacción contenía:

H₂O DEPC , 300 ng de molde de DNA, 0.5 mM de una mezcla de ATP, CTP y UTP, 10 µM GTP, 20 unidades de inhibidor de RNAsas HPRI, 10 U de la RNA polimerasa T3 (*Roche*) y 25 µCi de α³²P-GTP (400 mCi/pmol). A esta reacción se añadió 1µl de DNAsa (04716728001 *Roche*) y se incubó 1 hora a

Tabla M3. Secuencia específica para la generación de ribosondas

Tipo de RNA	Seg. diana	Secuencia (5'→3')	Long. (nt)	Formamida (%)
cRNA	M	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTACTCCAGT	30	34.9
	NP	AGTAGAAACAAGGGTATTTTTCCTTAATTG	30	32.7
	NS	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTATCATTA	30	30.6

37°C. Sobre los 20 µl de volumen final se añadieron 80 µl de H₂O DEPC y un volumen de fenol. Esta muestra se agitó con el vortex y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La fase acuosa se purificó usando una cromatografía de exclusión molecular S-300 (27513001 GE Healthcare). Los RNAs se resuspendieron en tampón de formamida (Bionova) y se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-7M urea y posterior autoradiografía. La radiactividad incorporada en RNA se cuantificó midiendo la radiación *Cerenkov* en un contador de centelleo líquido.

2.3.2 RT-qPCR para la detección de mRNAs del segmento NS sin procesar y procesados mediante *splicing*

La cuantificación de los RNAs derivados del *splicing* del segmento NS y el mRNA producto de la transcripción primaria del virus se realizó mediante RT-qPCR. Para ambos casos se partió de RNA extraído de células infectadas tal y como se describe en el apartado de Métodos 2.1 con la salvedad de que para el estudio de la transcripción primaria las células se trataron con cicloheximida (100 µg/ml) durante la adsorción del virus y durante 6 horas de infección. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo partiendo de 100 ng de RNA resuspendidos en 10 µl de H₂O DEPC y 10 µl del mix de reacción 2x (*Applied Biosystems*) tal y como indica el fabricante. De cada 20 µl de reacción se transfirieron

2 µl de cDNA directamente a una placa de PCR de 96 pocillos junto con 12,5 µl de la mezcla *Taqman Universal Master Mixture* (*Applied Biosystems*) y 1.25 µl de sondas *Taqman* diseñadas por *Applied Biosystems*. La PCR se llevó a cabo usando el sistema *PRISM 7000 Sequence* (*Applied Biosystem*) con el siguiente programa: 1 ciclo de 50°C durante 2 minutos seguido de 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, y 60°C durante 1 minuto. El límite de ciclos (Ct) fue determinado con el programa analítico SDS (*Applied Biosystems*). Se usaron diluciones seriadas de cDNA para asegurar que la amplificación tuviera lugar en un rango lineal. Para obtener la curva patrón se generaron productos de PCR cuyas secuencias eran idénticas a los segmentos NS sin haber sido procesados mediante *splicing* o tras ser procesados, dependiendo del experimento. Las secuencias de las sondas *Taqman* y de los oligos utilizados se encuentran detallados en la **Tabla M4**.

2.3.3 RT-qPCR para la detección de mRNAs del segmento NP

La cuantificación de los mRNAs del segmento NP producto de la transcripción primaria del virus y/o secundaria del virus de la gripe se realizó mediante RT-qPCR. Para ambos casos se partió de RNA extraído de células infectadas tal y como se describe en el apartado de Métodos 2.1 con la salvedad de que para el estudio de la transcripción primaria las células se trataron con cicloheximida (100 µg/ml)

Tabla M4. Secuencia de oligonucleótidos para la detección de NS			
Gen diana	Polaridad	Secuencia (5'→3')	Long. (nt)
NS1	Directo	CCATGTTGGAAAGCAGATAGTAGAGA	105
	Reverso	ATGTCAGTTATGTATCGCGAAGCA	
	Taqman	FAM-ATGAGGCGCTTACAATGA-NFQ	
NS2	Directo	GCAGGGTGACAAAGACATAATGGAT	93
	Reverso	GATGAGGACCCCAATTGCATTTT	
	Taqman	FAM-TAGTATGTCCTGAAACTTG-NFQ	
NS total	Directo	CATCGGAGGACTTGAATGGAATGAT	92
	Reverso	GTCCCCCATTCTCATTACTGCTT	
	Taqman	FAM-AAACTCTACAGAGATTCGC-NFQ	

durante la adsorción del virus y durante 6 horas de infección. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo partiendo de 200 ng de RNA y 10 pmoles de oligonucleótido específico de mRNA de NP. Se llevó a un volumen final de 5.5 µl de H₂O DEPC. El diseño del oligonucleótido se ha descrito previamente (Kawakami y col., 2011) y su secuencia se presenta en la **Tabla M5**. Se incubó la mezcla 10 minutos a 65°C y después 5 minutos a 4°C. Por otro lado se preparó el mix de reacción (5 µl de *First Strand buffer* de *Invitrogen*, 2 µl de 0.1 M de ditiotretitol y 1 µl de *Superscript II RT* a 50 U/µl de *Invitrogen*). Tras incubar esta reacción 5 minutos a 60°C, se transfirió al tubo con el RNA y el oligonucleótido específico. Se incubó la mezcla 1 hora a 60°C y después 15 segundos a 65°C. De cada 20µl de reacción se transfirieron 4µl de cDNA directamente a una placa de PCR de 96 pocillos junto con 10 µl de *Power SYBR green PCR master mix* (*Applied Biosystems*) y 1 µl de cada oligonucleotido a 10 µM (directo y reverso) de la **Tabla M5**. La PCR se llevó a cabo usando el Sistema *PRISM 7000 Sequence* (*Applied Biosystem*)

con el siguiente programa: 1 ciclo de 50°C durante 2 minutos seguido de 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, y 60°C durante 1 minuto. El límite de ciclos (Ct) fue determinado con el programa analítico SDS (*Applied Biosystems*). Se usaron diluciones seriadas de cDNA para asegurar que la amplificación tuviera lugar en un rango lineal.

3. Manipulación de cultivos celulares

3.1 Mantenimiento de cultivos celulares

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM suplementado con SBF al 10 % y aminoácidos no esenciales. Para levantar de la placa de cultivo las líneas celulares A549, 3T3, LCC-MK2 y MDCK se utilizó tripsina al 0.25 % (*Sigma T4665*) suplementada con EDTA al 0.02 % mientras que para la línea HEK293T se diluyó esta solución al 10 % en PBS. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C y con un 5 % de CO₂.

3.2 Transfecciones y reconstituciones de RNPs

Tabla M5. Secuencia de oligonucleótidos para la detección de NP

Gen diana	Polaridad	Secuencia (5'→3')	Long. (nt)
NP	RT	CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTT TTTAATTGTCGTAC	45
	Directo	GCTAGCTTCAGCTAGGCATC	20
	Reverso	GAGCTCTCGGACGAAAAGG	20

3.2.1 Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293T según el protocolo descrito previamente (Wigler y col., 1979). Brevemente, para la transfección de 1.10^7 células se mezclaron 10-20 µg de DNA en 500 µl de CaCl_2 a 250 mM y la mezcla se añadió gota a gota sobre 500 µl de HBS y se incubó durante 1 minuto. Posteriormente se añadió la mezcla sobre el cultivo celular gota a gota y se incubó a 37°C durante 24 horas o 5 días dependiendo del experimento.

3.2.2 Reconstitución de RNPs recombinantes

Se transfectaron cultivos de 25.10^4 células HEK293T con una mezcla de plásmidos (3 ng de pCMVPB1, 3 ng de pCMVPB2HIS, 1.5 ng de pCMVPA, 120 ng de pCMVNP y 120 ng del plásmido que codifica el vRNA molde correspondiente pHHEGFP, pHHCAT o pHHclon23). La mezcla de plásmidos se transfectó mediante coprecipitación con fosfato cálcico tal y como se describe en el apartado anterior.

3.2.3 Lipofectamina

Para la transfección de pequeñas moléculas interferentes de RNA (siRNA) se utilizó el agente transfectante *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) de la manera que se describe en el apartado 4 de

Métodos.

3.3 Adición de compuestos químicos

3.3.1 En el contexto de la reconstitución de RNPsGFP

Se reconstituyeron RNPsGFP como se describe en el apartado 3.2.2 en placas de 96 pocillos. Se llevó como control células transfectadas con 12 ng de pCAGGsGFP usando el método de fosfato cálcico descrito en el apartado 3.2.1. Los compuestos se diluyeron a una concentración de 50 µM en medio de cultivo (DMEM suplementado con 5 % SBF). Tras 2 horas se añadieron 100 µl de esta mezcla a las células.

Después de 5 días de incubación a 37°C se procedió a la toma de imágenes y cuantificación de la señal fluorescente como se indica en el apartado de Métodos 8.3.

3.3.2 En el contexto de la infección

Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes subcultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en PBSc suplementado con 5 µg/ml de SAB. Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a TA para que tuviera lugar

la adsorción. Tras la incubación se retiró el inóculo de virus y se incubaron las células con el compuesto diluido en DMEM suplementado con 5 % SBF.

3.4 Ensayo de viabilidad celular

Para medir la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa se recurrió al método colorimétrico MTT. Transcurridas 48 horas tras la adición de compuestos químicos a los cultivos celulares, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por 100 μ L de DMEM suplementado con 10 % SBF y 500 μ g/ml de MTT. Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C y 5 % CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se añadieron 100 μ L de la solución de solubilización (0.04 M HCl y 0.1 % Nonidet P-40 diluidos en isopropanol). Se agitó la placa hasta que la solución fuese homogénea y se empleó un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm para cuantificar la intensidad del color en cada pocillo.

4. Silenciamiento génico mediante siRNAs

El silenciamiento génico en las líneas celulares A549 y HEK293T se realizó en dos pasos según el siguiente protocolo. Se sembraron 2.10⁵ células en una placa M24, para que al día siguiente estuvieran entre el 60 y 80 % de confluencia. Para llevar a cabo la primera transfección se incubaron 1.5 μ L de *Lipofectamine 2000* en un volumen final de 50 μ L de *OPTIMEM* (*Invitrogen*) a TA durante 15 minutos. Esta preparación se mezcló con 50 μ L de *OPTIMEM* que contenían 2.5 μ L de siRNA 20 μ M en el caso de células A549 y 5 μ L de siRNA 20 μ M en el caso de HEK293T y se incubó a TA durante 15 minutos más. Finalmente la mezcla de transfección se añadió sobre el cultivo con 400 μ L de DMEM suplementado con 5 % de SBF y se incubó durante 6 horas a 37°C. Tras este período de tiempo se cambió el medio a las células con DMEM suplementado

con 5 % SBF. Tras 18 horas se llevó a cabo una segunda transfección en las mismas condiciones. Después de la incubación de 6 horas las células se dividieron en el número de placas adecuado para cada experimento. La utilización de estas células para los distintos experimentos se realizó 36 horas después de la segunda transfección de los siRNAs. Los siRNAs fueron diseñados por *Ambion* y su secuencia está especificada en la **Tabla M1**.

5. Técnicas virológicas

5.1 Infecciones

5.1.1 Por virus de la gripe

Las infecciones con las distintas cepas del virus de la gripe se realizaron a una MDI de 3 (alta multiplicidad) ó 0.001 (baja multiplicidad) según se indique en cada experimento. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes y cultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en PBSc suplementado con 5 μ g/ml de SAB. Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a TA para que tuviera lugar la adsorción. Tras la incubación se retiró el inóculo de virus y se incubaron las células con DMEM. En los experimentos de baja multiplicidad con la cepa VIC se suplementó el medio con 2.5 μ g/ml de tripsina. A continuación se incubaron las células infectadas con virus de la gripe a 37°C.

5.1.2 Por virus VSV

Las infecciones con VSV se realizaron a una MDI de 0.001 siguiendo el mismo protocolo que con el virus de la gripe descrito en el apartado anterior.

5.1.3 Por Adenovirus (Ad5)

Las infecciones con Ad5 se realizaron a una MDI de 6. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células A549 confluentes y cultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en DMEM. Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a TA para que tuviera lugar la adsorción. Tras la incubación se retiró el inóculo de virus y se incubaron las células con DMEM.

5.2 Generación de *stocks* de virus

Se infectaron monocapas de células MDCK con 1.10^{-5} ufp/célula. Tras 36-60 horas de incubación a 37°C y cuando el efecto citopático observado alcanzó el 50 % de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 2500 rpm y se guardaron congelados en porciones a -80°C.

5.3 Curvas de crecimiento

En el caso de las infecciones con el virus de la gripe y VSV se infectaron monocapas de células a la multiplicidad especificada en cada experimento y se recogieron porciones del sobrenadante a distintos tiempos de la infección. Posteriormente se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes como se describe en el apartado de Métodos 5.4. Se llevaron en paralelo triplicados de cada punto de la cinética viral. Se recogió el sobrenadante de cada réplica y se preparó una mezcla con el sobrenadante de los triplicados. La mezcla es la muestra de la que cual se analizó la infectividad por duplicado.

En el caso de las células infectadas por Ad5 se procedió a la lisis de las mismas para la liberación de los virus progenie. Para ello, se lavaron las monocapas de células infectadas y se incubaron con tripsina hasta que se levantaron de la placa. Se

transfirió el volumen a un tubo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 200 µl de PBS. Estas muestras se sometieron a tres ciclos consecutivos de congelación (-80°C) y descongelación (37°C). Tras el último ciclo de descongelación se sonicaron las muestras tres veces consecutivas durante 15 segundos y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Este sobrenadante se guardó a -80°C. El sedimento de células se resuspendió en 200 µl de PBS y se volvió a someter a los tres ciclos de congelación, descongelación y sonicación. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se guardó a -80°C. Los sobrenadantes obtenidos tras estos procesos se unieron en un solo tubo y se congelaron a -80°C hasta su uso en la determinación de infectividad.

5.4 Titulación de virus de la gripe y VSV mediante ensayo de formación de placa

Se infectaron monocapas de células MDCK (para titular virus de la gripe) o BHK-21 (para titular VSV) con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en tampón PBSc suplementado con 5 µg/ml de SAB. Tras 1 hora a TA se retiró el inóculo y se añadió un medio semisólido que contenía DMEM, 0.7 % agar, 1 % DEAE-dextrano y 2.5 µg/ml de tripsina. Cuando las placas de virus resultaron visibles (a las 72 horas aproximadamente), las células se fijaron con 10 % formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

TÍTULO VIRAL (ufp/ml): número de placas
x (1/ factor de dilución) x (1/volumen del
inóculo en ml)

5.5 Titulación de Ad5 mediante inmunocitoquímica

Se sembraron células HEK293T en placas de M24 en presencia de 100 µg/ml de polilisina (*FLUKA* 81356). Para ello se añadió la polilisina a los pocillos durante 20 minutos a TA y posteriormente se lavaron tres veces con PBS. A continuación se sembraron las células para que al día siguiente estuvieran confluentes. Al día siguiente se incubaron las células durante 1 hora a 37°C con 50 µl de diluciones decimales y seriadas de virus preparadas en DMEM. Tras este tiempo se retiró el inóculo y se lavaron las células con PBSc. Se añadió 0.5 ml de DMEM por pocillo y se incubaron las células a 37°C durante 48 horas. Tras este tiempo se retiró el medio y se dejaron secar las células en la cabina de bioseguridad durante 5 minutos. Para proceder a la fijación de las células se añadió gota a gota 0.5 ml de metanol al 100 % preincubado a -80°C durante 20 minutos. Para permeabilizar las células se incubaron las placas a -20°C durante 10 minutos. Se retiró el metanol y las células se lavaron 3 veces con 0.5 ml de PBS suplementado con SAB al 1 % (PBS-SAB). A continuación las células se incubaron con el anticuerpo primario Anti-Ad5 preparado en PBS-SAB durante 1 hora a 37°C. Tras este tiempo se lavaron las células con PBS-SAB y se añadió el anticuerpo secundario cabra anti ratón preparado en PBS-SAB. Las diluciones a las que se usaron los anticuerpos primarios se describen en la **Tabla M6**. Se lavaron las células tres veces con 0.5 ml de PBS-SAB y se procedió al revelado. Para ello, se mezclaron 20 µl de cromógeno *DAB* (*DAKO* K3466) con 1 ml de sustrato *DAB* (*DAKO* K3466). Se añadieron 250 µl de solución de revelado y se observó la aparición de precipitados en el microscopio óptico. El tiempo medio de incubación de las células con la solución de revelado fueron 10 minutos. Tras este tiempo se retiró la solución de revelado y se añadió 0.5 ml de PBSc por pocillo. Mediante observación de

las células con el microscopio óptico se eligió la dilución de virus en la que los precipitados fueron contables, aproximadamente 20-100 células por campo usando el aumento 20x del microscopio.

Se calcularon las unidades infectivas por pocillo usando la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO VIRAL (uff/ml): } \frac{[(\text{células teñidas por campo}) \times (\text{campos en un pocillo})]}{[(\text{vol de virus en ml}) \times (\text{factor de dilución})]}$$

El número de campos en un pocillo de M24 usando el aumento 20x es de aproximadamente 254.

6. Análisis de proteínas

6.1 Inmunofluorescencia

Se prepararon cultivos celulares sobre cristales de 10 mm de diámetro. Tras su infección o transfección, las células se lavaron con PBSc, se fijaron durante 20 minutos con formaldehído al 3 % y se permeabilizaron con 0.5 % Tritón-X-100 durante 5 minutos. Las células se bloquearon con PBS suplementado con 3 % SAB y se incubaron durante 1 hora a TA con los anticuerpos primarios. Tras realizar 3 lavados con PBS se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos durante 1 hora a TA y en oscuridad. La tinción de DNA de los núcleos celulares se realizó con DAPI incluyendo este reactivo junto con los anticuerpos secundarios. Finalmente, las células se lavaron con PBS y las preparaciones se montaron con *ProLong* (*Invitrogen*). Las imágenes se analizaron en un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiophot 200* equipado con una unidad confocal *BioRad Radiance 2100*. Se obtuvieron secciones ópticas cada 0.2 o 0.3 µM utilizando el *software LaserSharp v5.0* (*Biorad*) y las imágenes se procesaron con el programa *LaserPix v4* (*Biorad*). Las concentraciones de los

Tabla M6. Dilución de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Procedencia	Técnica usada	Dilución
NP	Conejo	WB	1:5000
PA-2	Ratón		1:100
PA-9	Ratón		1:100
β -actina	Ratón		1:15000
SFPQ/PSF	Ratón		1:1000
p54nrb/NonO	Conejo		1:1000
NP	Conejo	IF	1:5000
SFPQ/PSF	Ratón		1:500
Anti-Ad5	Conejo	IC	1:1000

anticuerpos primarios utilizados se resumen en la **Tabla M6**.

6.2 Inmunodetección de proteínas (*Western-Blot*)

Las proteínas diluidas en tampón de ruptura (0.08 M Tris-HCl pH 6.8, 2 % SdS, 10 % glicerol, 0.01 % de azul de bromofenol) se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida del porcentaje adecuado para cada experimento y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Immobilon P Millipore*) utilizando el sistema semi-líquido (*Bio-Rad*) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 %, pH 8.3).

Los filtros se bloquearon con una solución de SAB al 3 % en PBS para posteriormente proceder a su incubación con anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de PBS-0.1 % SAB-0.05 % Tween20. Se incubaron las membranas durante 1 hora a TA y tras tres lavados con PBS-0.25 % Tween20 se incubaron con los anticuerpos secundarios preparados en PBS-0.05 % Tween20. El análisis de la señal en los filtros se

detectó mediante reacciones de quimioluminiscencia (*Amersham*).

6.3 Inmunoprecipitación

Las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo que reconoce la etiqueta FLAG se llevaron a cabo usando el *kit* de *Sigma* (*FLAGIPTI*) y siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante. El resto de inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo según el protocolo descrito previamente (Falcón y col., 1999). Brevemente, por una parte se prepararon extractos solubles de células usando el tampón TNE con 1 % NP40. Por otra parte, se incubó la resina de agarosa (A6531 *Sigma*) unida a un anticuerpo de cabra anti ratón con 6 ng del anticuerpo de ratón específico de la proteína a inmunoprecipitar o con el correspondiente control negativo. Se lavaron estos complejos con el mismo tampón que se usó para preparar los extractos celulares. A continuación, se incubaron los extractos celulares con los complejos de anticuerpo y resina preformados. Tras 10 lavados con el mismo tampón de incubación, el material

unido se eluyó con tampón *Laemmli* y las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía.

6.4 Marcaje metabólico *in vivo* de proteínas celulares y virales

El marcaje *in vivo* de proteínas se llevó a cabo según el protocolo descrito previamente (Zurcher y col., 2000). Brevemente, las células fueron infectadas a alta multiplicidad de infección (3 ufp / célula) y a 6 horas de infección se lavaron con PBS y se incubaron 30 minutos a 37°C en medio DMEM carente de los aminoácidos metionina y cisteína. A continuación, se trataron las células durante 1 hora con el mismo medio suplementado con ³⁵S-Met/Cys (200 µCi/ml). Tras el marcaje, se recogieron los extractos totales en tampón *Laemmli* y se analizaron las muestras por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía.

7. Purificación de RNPs

7.1 Purificación de RNPs mediante cromatografía de afinidad con la etiqueta de poli-histidinas

Se reconstituyeron RNPs con una etiqueta de poli-histidinas en la subunidad PB2 como se describe en el apartado de Métodos 3.2.2 pero transfectando 10 veces más de los plásmidos pCMVPB1, pCMVPB2HIS y pCMVPA. El protocolo de extracción ha sido descrito previamente (Ortega y col., 2000). Brevemente, las células cultivadas en placas en 100 mm se recogieron en PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 rpm a 4°C. Tras un lavado con PBS se resuspendieron en 250 µl de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH 8, 7.5 mM sulfato amónico pH 7.9- 0.025 % Igepal CA-630) suplementado con inhibidores de proteasas sin EDTA (*Roche*) e inhibidores de RNAsas 1 u/µl (N251A *Promega*). Tras una incubación de

2 horas a 0°C con agitación cada 20 minutos con vórtex, se llevó a cabo la clarificación del extracto por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se recogieron los sobrenadantes y se diluyeron en 4.5 ml de tampón de unión a Níquel TN20 (50 mM Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 0.1 % Igepal CA-630, 20 mM, imidazol pH 8, 10 mM β-mercapto-etanol). Se incubó el extracto con 30 µl de la resina Ni²⁺-NTA-agarosa (*Probond-Invitrogen*) a 4°C durante 16-20 horas en presencia de inhibidores de proteasas sin EDTA (*Roche*). La resina se lavó con 100 volúmenes de tampón TN20. Finalmente el material retenido en la resina se eluyó con 30 µl de tampón de elución TE175 (20 mM Tris-HCl, 100 mM ClK, 5 mM MgCl₂, 0.1 % Igepal CA-630, 175 mM imidazol pH 8, 10 mM β-mercapto-etanol) y el material obtenido se guardó a 0°C para ensayos posteriores.

8. Análisis de la actividad de las RNPs

8.1 Transcripción *in vitro*

Las RNPs purificadas tal y como se describe en el apartado de Métodos 7.1 se incubaron con tampón de transcripción TT (50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1mM DTT, Actinomicina D 10 µg/ml, 1 u/µl RNAsin, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 10 µM GTP, 10 mCi α³²P-GTP (400 µCi/mmol)). El ensayo de transcripción *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Perales y Ortín, 1996). Se emplearon como cebadores de la transcripción 10 µg/ml de mRNA de β-globina humana (*Gibco*) o 100 µM ApG (*Sigma*). Tras 1 hora de incubación a 30°C los productos de la reacción se resuspendieron en tampón de formamida (*Bionova*) y se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-7M urea y posterior autoradiografía. La radiactividad incorporada en RNA se cuantificó midiendo la radiación *Cerenkov* en un contador de centelleo líquido.

8.2 Determinación de proteína CAT mediante ELISA

Para analizar la proteína CAT correspondiente a la actividad transcripcional de las RNPs reconstituidas *in vivo* se utilizó el *kit* comercial de Roche (11363727001), y se siguieron en todo momento las instrucciones del fabricante.

8.3 Cuantificación de la fluorescencia de GFP mediante procesamiento de imágenes con el programa *ImageJ*

Se tomaron imágenes de las células que expresan GFP a 12 *bites* usando el microscopio *Leica* DMI 6000B con una cámara digital *Orca* R2 (*Hamamatsu*). Las imágenes fueron adquiridas con el aumento de 10x (0.30 NA) y una resolución de 1344 x 1024 píxeles. La cuantificación de la señal

se llevó a cabo usando el programa *Image J*. Para automatizar la cuantificación de la señal en todos los pocillos se diseñó un algoritmo informático que tras convertir las imágenes en 8 *bit color*, imponía un umbral previamente establecido y específico de cada experimento. Este algoritmo contiene el código informático indicado en el cuadro.

9. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS

Los espectros de cada molécula se obtuvieron automáticamente con el analizador *MALDI-TOF/TOF* 4800 (*Applied Biosystems, Framingham, MA*). Para la adquisición y generación de la lista de picos de cada espectro se utilizó el *software* 4000 *Series Explorer* v3.5.28193 (*Applied Biosystems*).

10. ENSAYOS DE PATOGÉNESIS EN RATONES

10.1. Administración de los compuestos a los ratones por vía oral

Para los experimentos de patogénesis se utilizaron hembras de ratones BALB/c (*Harlan*) de 6 semanas de edad. Los grupos experimentales establecidos contaron con 6 animales. Todos los protocolos de trabajo fueron aprobados por el comité de ética del CNB-CSIC. Para la administración de los compuestos C9 y T-705 a los ratones se procedió primero a su correcta disolución. El compuesto C9 se resuspendió en agua del animalario a una concentración de 1 mg en 100 μ l. El compuesto T-705 se resuspendió en DMSO y aceite de maíz en una proporción 1:5 a una concentración de 1 mg en 100 μ l. Cada animal recibió 1 mg del compuesto correspondiente por día en dos dosis separadas en intervalos de 12 horas. Los compuestos fueron administrados por vía oral usando sondas orogástricas (*Instech FTP-22-25*).

```
dir = getDirectory("Choose a Directory ");
list = getFileList(dir);
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++) {
    path = dir+list[i];
    showProgress(i+1, list.length);
    if (endsWith(path, ".tif")) {
        open(path);
        run("8-bit Color", "number=256");
        run("Brightness/Contrast...");
        run("Close"); setThreshold (3, 255);
        //run("Threshold...");
        run("Measure");
        close();
    }
}
```

10.2. Inoculación y manejo de ratones infectados

Se procedió a la inoculación de los animales con virus 6 horas después de la primera administración de los compuestos correspondientes. Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se inocularon intranasalmente con 2000 ufp (5-10 veces la DL_{50}) del virus A/California/07/2009 en un volumen de 30 μ l de DMEM. La manipulación de ratones infectados se llevó a cabo en el área de inoculados del animalario del CNB.

10.3. Seguimiento de enfermedad y análisis de virulencia

Tras inocular intranasalmente a los ratones con el virus y administrarles el tratamiento correspondiente, se monitorizó diariamente su peso, los síntomas de la enfermedad y la supervivencia de los mismos durante un periodo de 8 días. Los animales que durante el experimento alcanzaron pérdidas de peso superiores al 25 % fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos de eutanasia establecidos.

11. Análisis de RNAs por secuenciación masiva

11.1. Purificación de RNAs

El RNA total de 1.10^6 células se extrajo usando el reactivo TRIzol (Ambion 15596018) tal y como se describe en el apartado 2.1 de Métodos. Se resuspendió el RNA en 20 μ l de H_2O DEPC y se añadió 1 μ l de DNasa (04716728001 Roche). Esta reacción se incubó 1 hora a 37°C. Sobre los 20 μ l de volumen final se añadieron 80 μ l de H_2O DEPC y un volumen de fenol. Esta muestra se agitó con el vortex y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La fase acuosa se precipitó con TNE 1x y 2,5 volúmenes de etanol a -20°C durante toda la noche. A continuación se centrifugó la muestra 10 minutos a 12000 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante

invirtiendo el tubo y se procedió a lavar el RNA contenido en el sedimento. Para ello, se añadió 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó la muestra 5 minutos a 7500 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante por inversión y se incubó la muestra a TA con la tapa abierta para permitir la evaporación del etanol. Finalmente, el RNA purificado se resuspendió en agua libre de nucleasas y la absorbancia fue medida a 260 nm en el NanoDrop ND-1000. Se hizo un control de calidad del RNA purificado usando el 2100 Bioanalyzer (Agilent). Se descartó el RNA ribosómico de las muestras usando el kit RiboZero™ (Illumina RZH1046). Se comprobó que la extracción del RNA ribosómico se había realizado correctamente analizando las muestras en el 2100 Bioanalyzer (Agilent). El proceso de secuenciación se llevó a cabo en el servicio del Centre de Regulació Genómica de Barcelona.

11.2. Análisis bioinformático

Tras confirmar que la calidad de las lecturas obtenidas era aceptable con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), dichas lecturas se alinearon con el genoma humano (GRCh37) o con el de ratón (GRCm38) usando el programa BWA (Li y col., 2009) con los parámetros por defecto. Para el análisis posterior de los resultados se contaron sólo las lecturas que alinearon en una única localización genómica. La asignación de lecturas a los distintos genes, se llevó a cabo mediante la función *featureCounts* incluida en el paquete de bioconductor Rsubread (Liao y col., 2014). Como referencia, se utilizó la versión de la anotación del genoma humano GRCh37.70 o GRCm38.75 de ratón y se consideraron las coordenadas de cada elemento genómico identificado como *gene*, lo que incluye mRNAs, pseudogenes, lincRNAs y otros RNAs. Se utilizó el paquete de Bioconductor edgeR (Robinson y col., 2010) para la normalización de los recuentos de lecturas por gen

y para el análisis de su expresión diferencial. Este método permite estimar la significación estadística de los resultados en ausencia de réplicas. De esta manera, se obtuvieron valores p , que fueron ajustados por *FDR* (Benjamini y Hochberg, 1995) para minimizar el efecto del testeo múltiple. A lo largo de todo el proceso de análisis, se utilizó el visualizador genómico *IGV* (Robinson *y col.*, 2011). Se consideraron genes candidatos los que tenían $FDR < 0.01$ o valor $p < 0.02$. Para establecer estos filtros y comprobar gráficamente su efecto en los resultados, se utilizó el visualizador *FIESTA* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>). Para comparar los resultados obtenidos en diferentes condiciones, se utilizaron diagramas de *Venn* generados con el programa *Venny* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

RESULTADOS

El genoma del virus de la gripe es 200.000 veces más pequeño que el genoma humano por lo que no es de extrañar que la mayoría de los pasos del ciclo infectivo dependan de funciones celulares. La identificación de tales vías celulares es crucial para entender la infección y para desarrollar mecanismos de control efectivos.

Con el objetivo de entender mejor esta relación entre el virus y la célula, en nuestro laboratorio se purificó la polimerasa viral expresada en células humanas y se identificaron varias proteínas celulares asociadas. La mayoría de los factores identificados están involucrados en la síntesis de RNA celular aunque también se encontraron factores de traducción y de transporte. La caracterización de los complejos formados intracelularmente por la polimerasa viral nos podría ayudar a comprender mejor cómo ésta lleva a cabo los procesos de replicación y transcripción viral y podrían dar a conocer funciones de la polimerasa viral aún desconocidas. Puesto que el silenciamiento de la expresión de una de estas proteínas llamada SFPQ/PSF tuvo un importante impacto en la producción viral, decidimos ahondar en su estudio como factor asociado.

Caracterización de uno de los factores celulares asociados a la polimerasa viral (SFPQ/PSF durante la infección por el virus de la gripe

Para estudiar el papel de la proteína SFPQ/PSF durante el ciclo infectivo de gripe inicialmente se analizó la expresión y localización de la proteína a lo largo de la infección. Estudios previos realizados en el laboratorio (Jorba y col., 2008), determinaron que la acumulación de la proteína SFPQ/PSF no variaba durante la infección. La localización de SFPQ/PSF en células humanas se analizó por inmunofluorescencia confocal. La proteína presentaba un patrón punteado dentro del núcleo. Esta señal era más intensa en la periferia nuclear y apenas se apreció en los nucleolos. No se observó

ningún cambio significativo en la distribución de la proteína durante la infección del virus de la gripe aunque se apreció un pequeño aumento de la tinción citoplásmica de la proteína a tiempos tardíos de la infección. Además se analizó la localización de SFPQ/PSF y de la proteína NP por inmunofluorescencia confocal de células infectadas con la cepa VIC del virus de la gripe. Se observó una colocalización muy clara a las 4-6 horas post-infección en el núcleo de las células infectadas.

En vista de estos resultados llevados a cabo por Núria Jorba, se decidió estudiar la relevancia y la función de la proteína SFPQ/PSF durante el ciclo de infección del virus de la gripe.

1. Análisis de la asociación de la proteína SFPQ/PSF con las RNPs virales durante la infección

Con el objetivo de verificar la asociación de SFPQ/PSF con la polimerasa viral mediante otro abordaje experimental se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación. Se transfectaron cultivos de

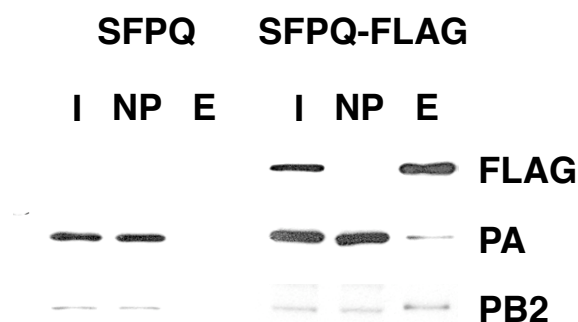


Figura R1. Asociación de SFPQ/PSF-FLAG con la polimerasa viral. Se transfectaron cultivos de células humanas HEK293T con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa y el plásmido que codifica SFPQ/PSF (S) o SFPQ/PSF marcado con una etiqueta FLAG (S-FLAG). A las 24 horas se recogieron extractos totales y se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos de FLAG. Los inmunoprecipitados fueron analizados por *Western-blot* usando anticuerpos específicos de PB2, PA o FLAG. I: input. E: elución de la resina por competición.

células humanas HEK293T con los tres plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa y el plásmido que codifica SFPQ/PSF marcado con una etiqueta FLAG. Como control se transfectaron células con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa y el plásmido que codifica SFPQ/PSF sin la etiqueta FLAG. A las 24 horas se recogieron los extractos celulares y se emplearon para inmunoprecipitación con un anticuerpo específico de la etiqueta FLAG. Los complejos intracelulares asociados a SFPQ/PSF-FLAG se eluyeron mediante competición con un exceso de péptido FLAG. Los inmunoprecipitados se analizaron por *Western-blot* con anticuerpos específicos de PB1, PB2, PA y FLAG como control de inmunoprecipitación. Los resultados se muestran en la **Figura R1** en la que se observa una clara co-inmunoprecipitación de SFPQ/PSF con la polimerasa viral que no se observa en el control.

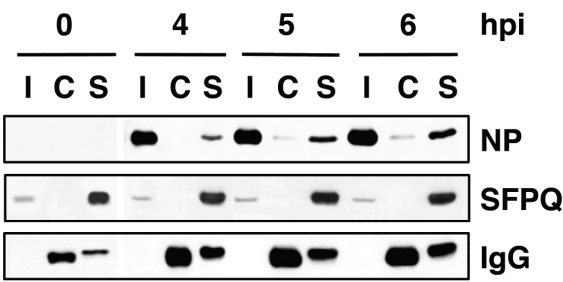


Figura R2. Asociación de SFPQ/PSF con las RNPs virales. Se infectaron cultivos de células humanas A549 con la cepa VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula. Se recogieron extractos totales de células a los tiempos post-infección indicados (hpi) y se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos de SFPQ/PSF o anticuerpos control. Los inmunoprecipitados fueron analizados por *Western-blot* usando anticuerpos específicos de SFPQ/PSF o NP. Se muestran las IgGs añadidas en cada preparación. I: input. C: anticuerpo control. S: anticuerpo específico de SFPQ/PSF.

Durante la infección la mayor parte de la polimerasa se encuentra formando parte de las RNPs virales,

por lo que a continuación se analizó si SFPQ/PSF se asociaba a las RNPs durante la infección mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Se infectaron cultivos de células A549 a alta multiplicidad con la cepa viral VIC y a distintos tiempos post-infección se recogieron los extractos celulares y se emplearon para inmunoprecipitación con un anticuerpo específico de SFPQ/PSF o con un anticuerpo control. Los inmunoprecipitados se analizaron por *Western-blot* con anticuerpos específicos de SFPQ/PSF y NP como marcador de las RNPs virales. Los resultados se muestran en la **Figura R2** en la que se observa una clara co-inmunoprecipitación de NP con la proteína SFPQ/PSF que no se detecta cuando se utiliza el anticuerpo control.

En vista de estos resultados se decidió estudiar la relevancia de SFPQ/PSF para la infección por el virus de la gripe mediante silenciamiento génico de la proteína.

2. Análisis de la relevancia de la proteína SFPQ/PSF durante la infección

2.1 Efecto del silenciamiento del factor SFPQ/PSF en la producción viral

Se transfectaron cultivos de células A549 con siRNAs específicos de SFPQ/PSF, o con un siRNA inespecífico usado como control, y posteriormente estos cultivos fueron infectados con la cepa de virus VIC a baja multiplicidad de infección. Se recogió el sobrenadante de las células infectadas a varios tiempos post-infección y se determinó el título viral mediante un ensayo de formación de placa en células MDCK. Los resultados de la cinética de infección se presentan en la **Figura R3A**. Se observó un retraso en la producción de virus en las células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF en comparación con las células control y el título final de virus se

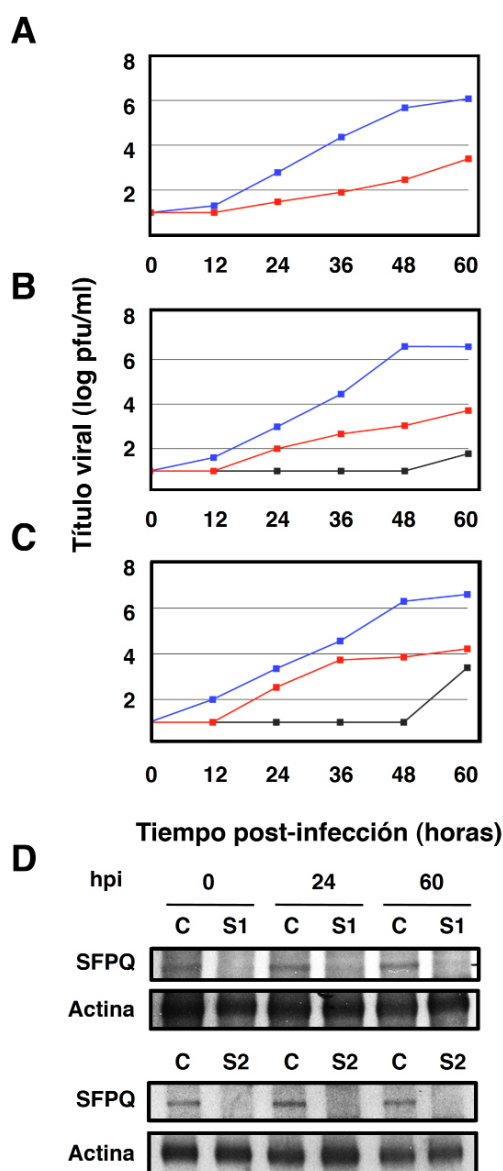


Figura R3. Cinética de multiplicación del virus de la gripe en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF. Se transfectaron cultivos de células humanas A549 con siRNAs control o específicos de SFPQ/PSF y se infectaron con el virus de la gripe a una multiplicidad de 0.001 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados (horas) se recogieron porciones del sobrenadante que se usaron para determinar el título viral mediante ensayo de formación de placa. Los resultados presentados son representativos de 2 o 3 experimentos independientes. (A) Los cultivos fueron transfectados con siRNA control (azul) o el siRNA-1 específico de SFPQ/PSF (rojo) e infectados con la cepa VIC. (B) Los cultivos fueron transfectados con siRNA control (azul), siRNA-1 (rojo) o siRNA-2 (gris) e infectados con la cepa de virus rVIC. (C) Los cultivos de células fueron transfectados con siRNA control (azul), siRNA-1 (rojo) o siRNA-2 (gris) e infectados con la cepa WSN. (D) A los tiempos post-infección indicados (hpi) se determinó la acumulación de la proteína SFPQ/PSF en los cultivos transfectados con el siRNA control (C) o con siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1 o S2) por *Western-blot* usando anticuerpos específicos. Se usó actina como control de carga.

redujo de 2 a 3 unidades logarítmicas. El nivel de silenciamiento de SFPQ/PSF se verificó mediante *Western-blot* y se presenta en la **Figura R3D**. Estos resultados sugieren que SFPQ/PSF desempeña un papel muy importante durante la infección del virus de la gripe.

Para verificar que la inhibición en el crecimiento del virus es debida al silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF y no a un efecto espurio de los siRNAs, se llevaron a cabo experimentos similares usando otro siRNA específico de SFPQ/PSF pero que reconocía una secuencia del mRNA

diferente. De nuevo, se observó una reducción de 2 a 3 unidades logarítmicas en la producción final de virus. Se obtuvieron resultados similares cuando se infectaron las células con otras cepas de gripe como WSN (**Figura R3B**) y rVIC (**Figura R3C**). Estos resultados confirman que la proteína SFPQ/PSF es un factor humano muy importante para la multiplicación del virus de la gripe.

Para saber si SFPQ/PSF es relevante en un único ciclo infectivo se transfectaron cultivos de células A549 con siRNAs específicos de SFPQ/PSF o con un siRNA inespecífico usado como control y posteriormente se infectaron con el virus de la gripe a alta multiplicidad de infección. A varios tiempos post-infección se recogió el sobrenadante de las células infectadas y se determinó el título viral mediante un ensayo de formación de placa en células MDCK. Los resultados de la cinética de infección con la cepa VIC se presentan en la **Figura R4A** y con la cepa WSN en la **Figura R4B**. Se observó un retraso en la producción de virus en las células en

las que se silenció SFPQ/PSF frente a las células control y el título final de virus se redujo en casi una unidad logarítmica. El nivel de silenciamiento de SFPQ/PSF se verificó mediante *Western-blot* y se presenta en la **Figura R4C**. Estos resultados sugieren que SFPQ/PSF participa en alguna etapa temprana del ciclo infectivo y por consiguiente la producción final de virus se afecta gravemente cuando se silencia su expresión.

2.2 Relevancia de SFPQ/PSF para la infección por virus de otras familias

SFPQ/PSF es una proteína a la que se le han asignado múltiples funciones celulares en varios pasos de la transcripción celular y del procesamiento del RNA post-transcripcional. Por este motivo, podría ser que el silenciamiento de su expresión conllevara la reducción de la producción viral de una forma indirecta. Este hecho no es muy probable ya que el silenciamiento de SFPQ/PSF no altera el patrón de síntesis general de proteínas celulares (Jorba, 2009). Aún así se llevaron a cabo ciertos controles para asegurar que el requerimiento de SFPQ/PSF por parte del virus de la gripe es específico. Se estudió la multiplicación de dos virus pertenecientes a distintas familias en células en las que la expresión de SFPQ/PSF estaba silenciada: el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) que se usó como un ejemplo alternativo de virus RNA de hebra negativa y Adenovirus tipo 5 (Ad5) como un ejemplo de un virus nuclear que depende fuertemente de la maquinaria de transcripción y de *splicing* celular. Cultivos de células A549 en los que se transfectaron siRNAs específicos de SFPQ/PSF o inespecíficos como control se infectaron con VSV o con Ad5 y la acumulación de virus en el sobrenadante (VSV) o en las células infectadas (Ad5) se determinó mediante ensayo de placa en células BHK21 (VSV) o mediante inmunocitoquímica en HEK293T (Ad5). Tal y como se presenta en la **Figura R5A** y **R5B**, la

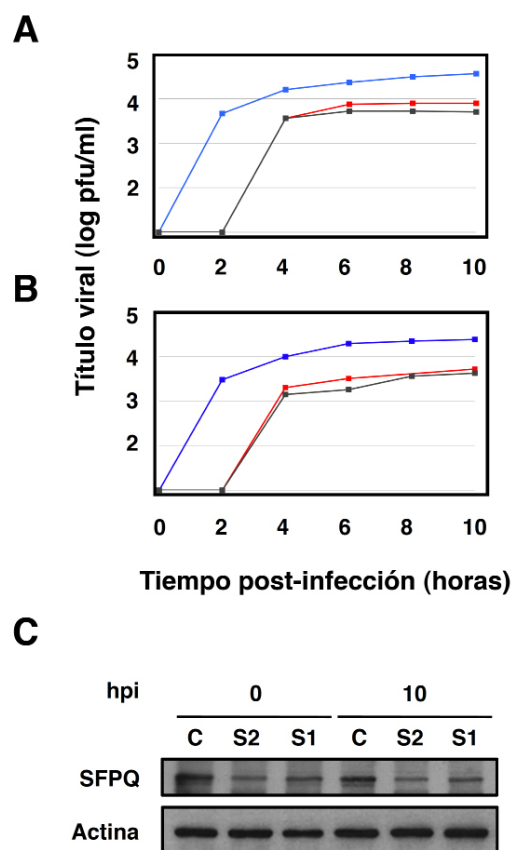


Figura R4. Cinética de multiplicación del virus de la gripe en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF infectadas a alta multiplicidad. Se transfectaron cultivos de células humanas A549 con siRNAs control o específicos de SFPQ/PSF y se infectaron con el virus de la gripe a una multiplicidad de 3 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados (horas) se recogieron porciones del sobrenadante que se usaron para determinar el título viral mediante ensayo de formación de placa. Los resultados presentados son representativos de dos experimentos independientes. (A) Los cultivos fueron transfectados con siRNA control (azul), siRNA-1 (rojo) o siRNA-2 (gris) e infectados con la cepa VIC o (B) con la cepa WSN. (C) A los tiempos post-infección indicados (hpi) se determinó la acumulación de la proteína SFPQ/PSF en los cultivos transfectados con el siRNA control (C) o con siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1 o S2) por *Western-blot* usando anticuerpos específicos. Se usó actina como control de carga.

multiplicación de ninguno de estos virus se vio afectada significativamente por el silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF, sugiriendo que este factor celular es específicamente importante para la multiplicación del virus de la gripe.

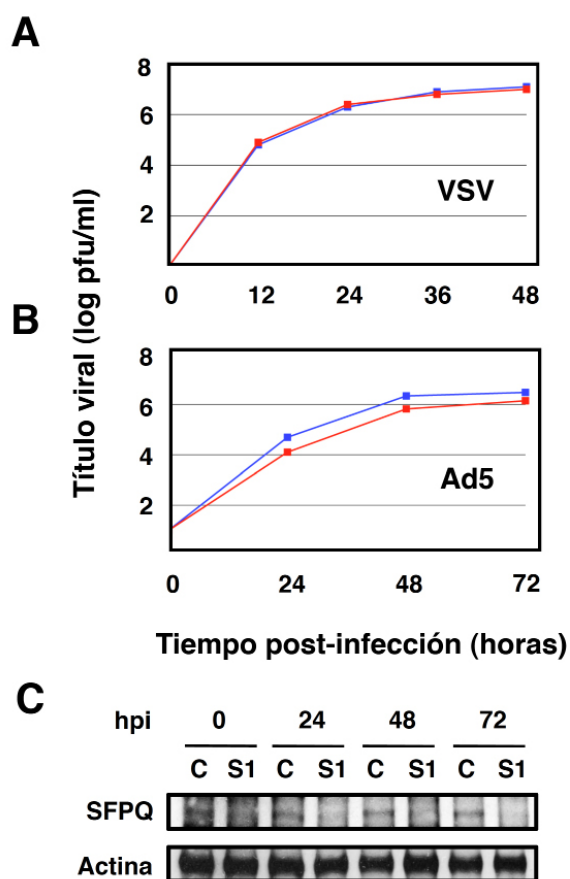


Figura R5. Cinética de multiplicación de VSV y Ad5 en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF. Se transfectaron cultivos de células humanas A549 con siRNAs control o con el siRNA-1 específico para SFPQ/PSF y posteriormente se infectaron con VSV o Ad5. Los resultados presentados son representativos de 2 o 3 experimentos independientes. (A) Los cultivos fueron transfectados con siRNA control (azul) o siRNA-1 (rojo) e infectados con VSV a una multiplicidad de 0.001 ufp/célula. (B) Los cultivos fueron transfectados con siRNA control (azul) o siRNA-1 (rojo) e infectados con Ad5 a una multiplicidad de 6 ufp/célula. (C) A los tiempos post-infección indicados (días) la acumulación de la proteína SFPQ/PSF se determinó en los cultivos transfectados con siRNAs control (C) o específicos de SFPQ/PSF (S1) por *Western-blot* usando anticuerpos específicos de SFPQ/PSF y actina como control de carga.

2.3 Impacto del silenciamiento de la proteína p54nrb/NonO en la producción viral

Está ampliamente descrito en la bibliografía que la proteína SFPQ/PSF se asocia establemente a la proteína p54nrb/NonO (Shav-Tal y Zipori, 2002)

por lo que es importante distinguir si el virus de la gripe requiere la expresión de SFPQ/PSF o del heterodímero SFPQ/PSF-p54nrb/NonO para llevar a cabo la producción de virus progenie. Para ello, se analizó la multiplicación del virus de la gripe en células A549 en las que se habían transfectado siRNAs específicos de p54nrb/NonO o inespecíficos como control. En este punto es importante destacar que el silenciamiento de SFPQ/PSF no afecta aparentemente a la acumulación de p54nrb/NonO y viceversa (datos no mostrados). El silenciamiento de la proteína se controló por *Western-blot* usando anticuerpos específicos. Como se indica en la **Figura R6**, no se observó una reducción significativa del título viral cuando se infectaron células transfectadas con los siRNAs específicos de p54nrb/NonO con la cepa VIC (**Figura R6A**) aunque sí se observó una pequeña reducción cuando se infectaron con la cepa WSN (**Figura R6B**). Por tanto, se requiere esencialmente la expresión de SFPQ/PSF y no del heterodímero SFPQ/PSF-p54nrb/NonO para llevar a cabo el ciclo de infección de gripe.

3. Caracterización de la función de SFPQ/PSF durante la infección

3.1 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en la localización de RNPs virales durante la infección

Para analizar el fenotipo de la infección viral en células en las que la expresión de SFPQ/PSF fue silenciada se estudió la localización de las RNPs progenie por inmunofluorescencia confocal usando anticuerpos específicos de NP y de SFPQ/PSF. Los resultados se presentan en la **Figura R7**. Tal y como se esperaba la intensidad de señal de SFPQ/PSF disminuyó en las células en la que se silenció la expresión de dicha proteína en comparación con las células control, aunque el silenciamiento no tuvo lugar en el 100 % de las células (flechas

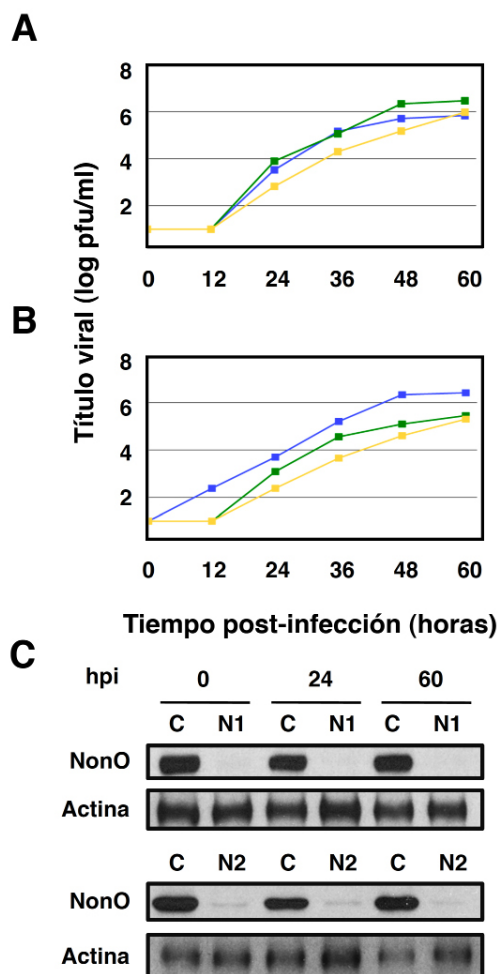


Figura R6. Cinética de multiplicación del virus de la gripe en células en las que se silenció la expresión de p54nrb/NonO. Se transfectaron cultivos de células humanas A549 con siRNAs control (C), o con siRNAs específicos de p54nrb/NonO (N1 y N2) y posteriormente fueron infectados con el virus de la gripe a una multiplicidad de 0.001 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados (horas) se recogieron porciones de sobrenadante que se usaron para determinar el título viral mediante ensayo de formación de placa. Los resultados presentados son representativos de 2 o 3 experimentos independientes. (A) Los cultivos fueron transfectados con siRNA control (azul), siRNA-N1 (verde) o siRNA-N2 (amarillo) e infectados con la cepa VIC o (B) con la cepa WSN. (C) A los tiempos post-infección indicados (horas), la acumulación de la proteína p54nrb/NonO fue determinada en cultivos transfectados con siRNAs control (C) o con siRNAs específicos de p54nrb/NonO (N1 o N2) por *Western-blot* usando actina como control de carga.

blancas). En las células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF se observó una disminución general de la señal de NP en comparación con las células control (**Figura R7A**). Por el contrario, en aquellas células en las que el nivel de SFPQ/PSF era similar al descrito en células control, el nivel de proteína NP era también comparable (flecha blanca de la **Figura R7A**). Estas señales se cuantificaron en campos al azar de células control o células en las que la expresión de SFPQ/PSF estaba silenciada (**Figura R7B**). El análisis de esta cuantificación permite distinguir una correlación lineal entre las señales de inmunofluorescencia de la proteína SFPQ/PSF y NP.

El hecho de que no todas las células de un cultivo se transfecten con los siRNAs hace pensar que los bajos niveles en la producción de virus que se observan en la **Figura R3** (líneas roja y gris) podrían ser producto de aquellas pocas células que no se han transfectado con los siRNAs específicos.

3.2 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en el *splicing* de mRNAs virales

La reducción en la síntesis de proteínas virales en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF podría ser debida a defectos en la replicación del RNA viral, en la transcripción viral, en el *splicing* o en la traducción de mRNAs virales. Como SFPQ/PSF ha sido descrito en la bibliografía como un factor que forma parte del *spliceosoma* celular (Meissner et al., 2000), se analizó primeramente si el silenciamiento de SFPQ/PSF repercutía en el *splicing* de los mRNAs virales. Para ello, se determinaron las cantidades de mRNAs de NS1 y NS2 en células en las que la expresión de SFPQ/PSF estaba silenciada así como en células control, mediante RT-qPCR usando sondas *Taqman* (Tabla M4).

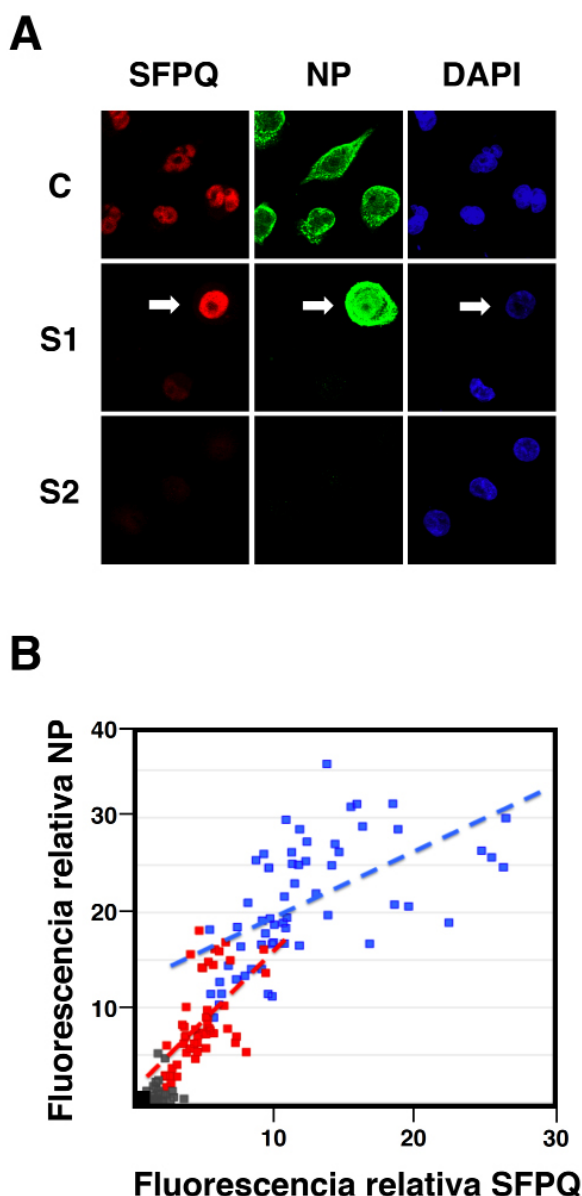


Figura R7. Análisis fenotípico de la infección del virus de la gripe en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF. Se transfectaron cultivos de células humanas A549 con siRNAs control (C) o siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1 o S2) y posteriormente fueron infectados con la cepa VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula. Los cultivos se fijaron a las 6 horas post-infección y se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos de SFPQ/PSF y NP. (A) Las imágenes presentadas son secciones de microscopía confocal representativas que muestran la presencia del núcleo (DAPI en azul), SFPQ/PSF (rojo) y NP (verde). (B) Representación gráfica de la cuantificación de las señales de NP (eje vertical) y SFPQ/PSF (eje horizontal) obtenidas en campos elegidos al azar de 1024 x 1024 píxeles. Se representa además la línea de regresión. Azul: cultivos de células transfectadas con siRNAs control. Rojo: cultivos de células transfectadas con el siRNA-1 de SFPQ/PSF. Gris: cultivos de células transfectadas con el siRNA-2 de SFPQ/PSF. Los puntos negros indican la señal del fondo obtenida de los cultivos incubados únicamente con el anticuerpo secundario.

3.3 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en la acumulación de RNAs virales

Una vez se concluyó que SFPQ/PSF no tenía ningún papel en el *splicing* de los mRNAs virales se decidió estudiar otros procesos virales que se llevasen a cabo en el núcleo de una célula infectada como la replicación y la transcripción viral ya que la proteína SFPQ/PSF no cambia su patrón nuclear a lo largo de la cinética de infección. Para ello, se cuantificaron los niveles de acumulación de los vRNAs, cRNAs y mRNAs de varios segmentos virales en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF así como en células control. Se aisló el RNA total de las células infectadas a alta multiplicidad a varios tiempos post-infección y se determinaron las cantidades de RNAs específicos de los segmentos virales NP, NS y M mediante hibridación con sondas específicas marcadas en su extremo 5' con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Tabla M2). Los resultados de un experimento representativo se muestran en la **Figura R8**. En las células control, la cinética de acumulación de los

La proporción de mRNA de NS1 frente al mRNA de NS total fue similar en ambas condiciones experimentales (la relación de mRNA de NS1 en células control frente el mRNA de NS total en células en la que la expresión de SFPQ/PSF estaba silenciada fue de $1,016 \pm 0,035$ cuantificada en 7 experimentos independientes).

Con este resultado podemos concluir que el *splicing* del mRNA, al menos del segmento NS, del virus de la gripe no se afecta cuando se silencia la expresión de SFPQ/PSF.

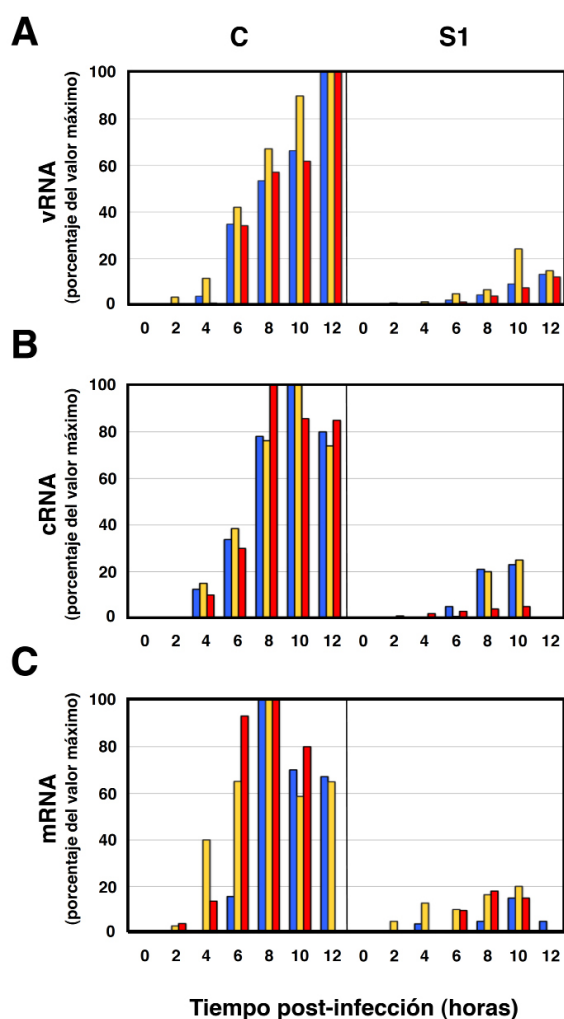


Figura R8. Acumulación de los RNAs de hebra positiva y negativa durante la infección del virus de la gripe en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF. Cultivos de células humanas A549 fueron transfectados con siRNAs control (C) o siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1) y posteriormente fueron infectados con virus gripal de la cepa VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula. El RNA total de los cultivos fue extraído a los tiempos post-infección indicados (horas) y se usó para la determinación de la cantidad de vRNA (A), cRNA (B) o mRNA (C) por hibridación con sondas específicas de los segmentos NP (azul), NS (amarillo) y M (rojo). Los datos se presentan como porcentaje de la señal máxima y son representativos de 3 experimentos de infección independientes.

distintos RNAs siguió un patrón similar al descrito previamente en la bibliografía (Robb, Smith, Vreede, & Fodor, 2009) mientras que la acumulación de

todos los RNAs virales analizados en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF se redujo de 4 a 5 veces respecto al control. Este resultado indica que la expresión de la proteína SFPQ/PSF se requiere para la replicación del RNA viral pero no se puede discriminar si se trata de un efecto directo en la replicación viral o si afecta a la transcripción viral y eso repercute finalmente en el proceso de replicación.

Para poder responder a esta pregunta se usaron varias estrategias que nos permitieron estudiar individualmente los procesos de replicación y transcripción viral que están acoplados durante el ciclo infeccioso. Una de estas estrategias consistió en estudiar la acumulación de mRNAs virales procedentes de la transcripción primaria en células control o en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF.

3.4 Efecto del silenciamiento de SFPQ/PSF en la transcripción primaria del virus de la gripe

Se infectaron cultivos de células A549 a alta multiplicidad con la cepa VIC en presencia o ausencia de cicloheximida. La cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas que son esenciales para llevar a cabo los procesos de replicación viral. Por tanto, en estas condiciones sólo se detectan aquellos mRNAs virales que proceden de la transcripción primaria del virus de la gripe y no de la secundaria. La acumulación de mRNAs de NS se determinó mediante RT-qPCR usando sondas *Taqman* (Tabla M4) y el resultado se muestra en la **Figura R9**. Este resultado demuestra que el silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF conlleva una reducción de 3 veces de la transcripción primaria del segmento NS del virus de la gripe (**Figura R9A**).

Para verificar que ha tenido lugar la inhibición de la multiplicación viral en presencia de cicloheximida,

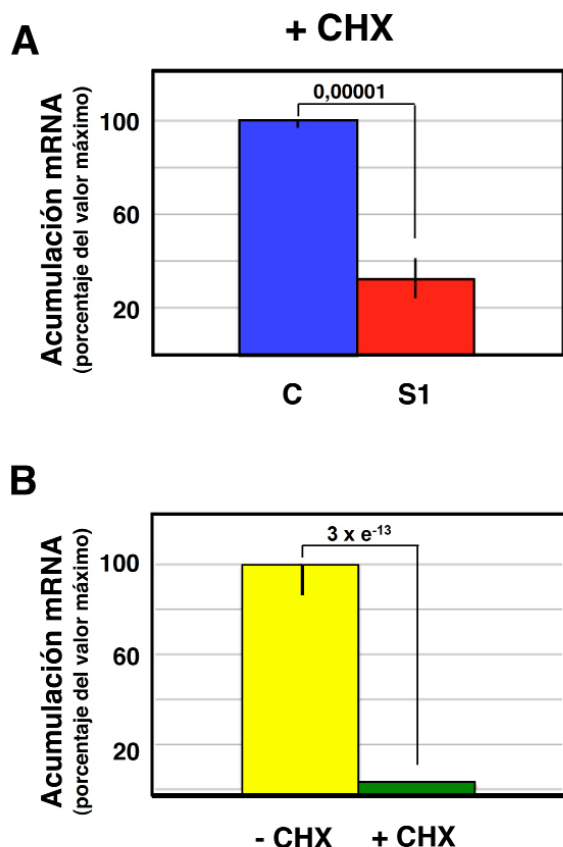


Figura R9. Acumulación de mRNA durante la infección del virus de la gripe en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF y se trataron con cicloheximida. Cultivos de células humanas A549 fueron transfectados con siRNA control (C) o específicos de SFPQ/PSF (S1) y posteriormente fueron infectados con la cepa VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula durante 6 horas en presencia o ausencia de cicloheximida (100 μ g/ml). La acumulación del RNA viral se determinó mediante RT-qPCR usando sondas específicas para el segmento NS. Se determinó la significación del experimento mediante el test T de *Student*. (A) Se presenta la media y la desviación estándar de 6 determinaciones independientes de la acumulación de RNA viral en células transfectadas con siRNAs control (C) o siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1). (B) Se presenta la media y la desviación estándar de 6 determinaciones independientes de la acumulación de mRNA de células infectadas tratadas o no con cicloheximida.

se cuantificaron los niveles de mRNA del segmento NS en células infectadas y tratadas o no con cicloheximida. Los resultados se muestran en la **Figura R9B**, donde se observa una reducción

de 50 veces en los niveles de mRNA viral tras el tratamiento con la cicloheximida.

Estos resultados sugieren que la proteína SFPQ/PSF es requerida para la transcripción primaria del virus de la gripe pero no descartan que también tenga un efecto en la replicación del RNA viral o en los procesos de transcripción secundaria.

3.5 Estudio del efecto de SFPQ/PSF en la replicación y/o transcripción secundaria del virus

Para estudiar de forma independiente el efecto de la expresión de SFPQ/PSF en la replicación viral y en la transcripción secundaria, se recurrió a un sistema de replicón de RNPs recombinantes. En este sistema la transcripción primaria no es relevante, ya que las proteínas virales se aportan al sistema en *trans* mediante la expresión de plásmidos. Se transfectaron cultivos de células humanas HEK293T con siRNAs específicos de SFPQ/PSF o inespecíficos como control y posteriormente se transfectaron plásmidos que codificaban las tres subunidades de la polimerasa, NP y un plásmido genómico que contiene el gen *cat* en polaridad negativa flanqueado por las secuencias conservadas del segmento NS. El silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF se controló mediante *Western-blot* (**Figura R10D**) y la acumulación de proteína CAT se usó como indicador de la actividad total del replicón. Los resultados indican que el silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF conlleva una reducción en la expresión de proteína CAT de 5 veces respecto al control (**Figura R10A**). Para determinar si esta reducción era consecuencia de un problema en la replicación del RNA viral, en la transcripción secundaria o en ambas se aisló el RNA total de las células y se usó para determinar la acumulación de RNAs de polaridad negativa (producto de la replicación viral) y de polaridad positiva (producto esencialmente de la transcripción

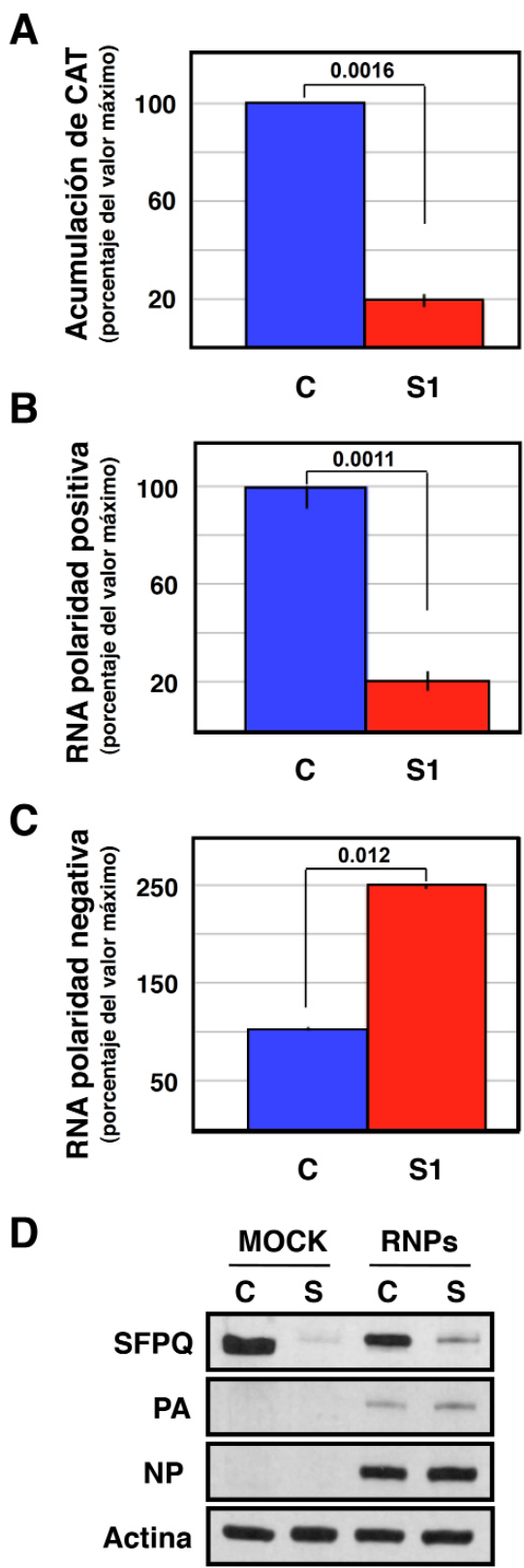


Figura R10. Acumulación del RNA de polaridad positiva o negativa en el sistema de replicón de RNPsCAT. Se transfectaron cultivos de células humanas HEK293T con siRNAs control (C) o específicos de SFPQ/PSF (S1). Cuando se observó que la expresión de SFPQ/PSF estaba silenciada, los cultivos se transfectaron con los plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa viral y NP, así como el plásmido genómico que expresa el gen pseudoviral que contiene el gen *cat* en polaridad negativa. Como control los cultivos se transfectaron con plásmidos vacíos. A las 24 horas post-transfección, se prepararon extractos totales de las células y se aisló el RNA total de las muestras. La significación de los resultados se calculó usando el test T de *Student*. Los valores que se indican representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos de transfección independientes. (A) La acumulación de la proteína CAT se indica como porcentaje del valor máximo. (B) La acumulación del RNA de hebra positiva se determinó por hibridación con sondas específicas de *cat* y se presentan como porcentaje del valor máximo. (C) La acumulación del RNA de hebra negativa se determinó por hibridación con sondas específicas de *cat* y se presentan como porcentaje del valor máximo. (D) El nivel de silenciamiento de SFPQ/PSF se controló por *Western-blot* usando anticuerpos específicos y actina como control de carga. El nivel de expresión de PA y NP también se determinó mediante anticuerpos específicos.

en la transcripción secundaria del virus cuando se silenció la expresión de SFPQ/PSF mientras que los niveles de replicación viral aumentaron dos veces en estas condiciones (**Figura R10C**). Estos resultados indican que la expresión de SFPQ/PSF se requiere para la transcripción secundaria del virus de la gripe pero no para la replicación viral.

3.6 Efecto de la sobre-expresión de SFPQ/PSF en los niveles de mRNA viral

El silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF se traduce en una inhibición de la transcripción de los mRNAs virales y en último término en la producción de virus por lo que es esperable que la sobre-expresión de esta proteína tenga efectos opuestos. Para comprobarlo, se transfectaron células HEK293T con el plásmido pcDNA3-SFPQ/

secundaria) mediante hibridación con sondas específicas (Tabla M2). Como se muestra en la **Figura R10B**, se observó una reducción de 5 veces

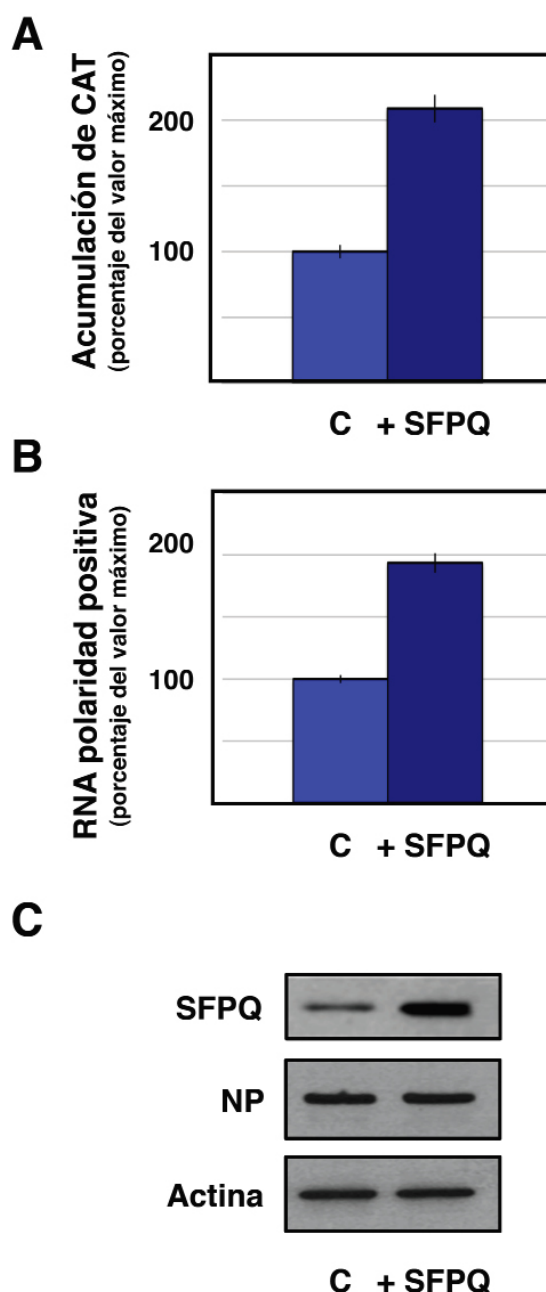


Figura R11. Efecto de la sobre-expresión de SFPQ/PSF en la transcripción viral y en la multiplicación del virus de la gripe. (A) Cultivos de células humanas HEK293T se transfectaron con el plásmido pcDNA3-SFPQ/PSF-FLAG, con los plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa viral y NP, así como el plásmido genómico que expresa el gen pseudoviral que contiene el gen *cat* en polaridad negativa. Como control, los cultivos se transfectaron con plásmidos vacíos. A las 24 horas post-transfección, se prepararon extractos totales de células y se aisló el RNA total de las muestras. (A) La acumulación de la proteína CAT se indica como porcentaje del valor máximo. (B) La acumulación del RNA de hebra positiva se determinó por hibridación con sondas específicas de *cat* y se presentan como porcentaje del valor máximo. (C) El nivel de sobre expresión de SFPQ/PSF se controló por *Western-blot* usando anticuerpos específicos de SFPQ/PSF y se usó actina como control de carga. El nivel de expresión de NP también se determinó mediante anticuerpos específicos.

PSF-FLAG junto con los plásmidos que codificaban las tres subunidades de la polimerasa, NP y un plásmido genómico que contiene el gen *cat* en polaridad negativa flanqueado por las secuencias conservadas del segmento NS. La sobre-expresión de SFPQ/PSF se controló mediante *Western-blot* (Figura R11C). La acumulación de proteína CAT se usó como un indicador de la actividad total del replicón. Los resultados (Figura R11A) indican que la sobre-expresión de SFPQ/PSF conlleva un

aumento en la expresión de proteína CAT de 4 veces aproximadamente. Para determinar si este cambio era debido a un aumento de la transcripción del mRNA, se aisló el RNA total de las células y se usó para determinar la acumulación de RNAs virales de polaridad positiva mediante hibridación con sondas específicas (Tabla M2). Como se muestra en la Figura R11B, se observó un aumento de 4 veces en la transcripción secundaria del virus cuando se sobre-expresó SFPQ/PSF.

Para saber si el aumento en la transcripción viral provocado por la sobre-expresión de SFPQ/PSF se traducían en una mayor producción de virus, se transfectaron células HEK293T con el plásmido pcDNA3-SFPQ/PSF-FLAG y 20 horas después se infectaron con la cepa rVIC del virus de la gripe a alta multiplicidad de infección. A varios tiempos post-infección se recogió el sobrenadante de las células infectadas y se determinó el título viral mediante un ensayo de formación de placa en células MDCK. Se observó que la producción de virus no cambiaba en células en las que se sobre expresó SFPQ/PSF respecto a células que expresaban los niveles

endógenos de la proteína (resultado no mostrado). Este resultado sugiere que la cantidad de SFPQ/PSF endógena es la adecuada para producir títulos virales óptimos.

4. Estudio del mecanismo molecular de acción del factor SFPQ/PSF durante la transcripción viral

Un posible mecanismo que explicaría los efectos del silenciamiento de SFPQ/PSF en la transcripción viral podría ser que la interacción de SFPQ/PSF con la RNP aumentase la afinidad de la polimerasa viral por la estructura *cap* de los mRNAs celulares durante el proceso de *cap snatching*. La Kd descrita para la interacción del dominio de unión a *cap* de PB2 por el 7mGTP es de aproximadamente 170 μ M (Guilligay y col., 2008) mientras que la afinidad del heterotrímero de la polimerasa por una resina de 7mGTP-Sefarosa es mucho mayor (Resa-Infante, Recuero-Checa, Zamarreño, Llorca, & Ortín, 2010). Este resultado hace pensar que hay factores celulares que podrían interactuar con la polimerasa viral provocando un aumento en su afinidad de unión al *cap* de los mRNAs celulares. Para probar si SFPQ/PSF es uno de estos factores celulares se realizó un ensayo de transcripción *in vitro* de RNPs recombinantes en presencia de concentraciones crecientes de un donador de *cap*.

4.1 Efecto de SFPQ/PSF en la iniciación de la transcripción *in vitro* de RNPs recombinantes

Se generaron RNPs recombinantes mediante transfección de plásmidos que codificaban las tres subunidades de la polimerasa, NP y un vector genómico que contiene el cDNA del segmento NS con una delección (clon 23) en células HEK293T en las que se había silenciado la expresión de SFPQ/PSF y en células control. Los extractos celulares se usaron para llevar a cabo un ensayo de transcripción

in vitro usando el mRNA de β -globina como donador de *cap*. En este ensayo se probó un amplio rango de concentraciones de donador de *cap* para saber si había una respuesta diferencial en la iniciación de la transcripción en células control o en las que se ha silenciado SFPQ/PSF. Los resultados muestran que no hay un cambio aparente en el perfil de síntesis de RNA viral cuando se silenció la expresión de SFPQ/PSF (**Figura R12B**). Sin embargo, sí se observó un cambio claro en la distribución del tamaño de los productos del RNA sintetizado que además era independiente de la concentración de donador de *cap* (**Figura R12A**). En presencia de SFPQ/PSF el RNA viral resultante de la transcripción *in vitro* tiene un tamaño igual o superior al del molde (utilizado en el gel como marcador). Este perfil es típico de mRNAs a los que se le ha añadido colas de poli-A de distintos tamaños. Por el contrario, en células en las que se silenció la expresión de SFPQ/PSF se pudo encontrar una variedad de tamaños de RNAs siempre más pequeños que el del molde. Para caracterizar más en detalle dichos transcritos, éstos se separaron en fracciones de mRNAs poliadenilados (poli A⁺) y sin poliadenilar (poli A⁻).

4.2 Análisis de la contribución de SFPQ/PSF a la poliadenilación de mRNAs virales

Se generaron RNPs recombinantes mediante transfección de plásmidos que codificaban las tres subunidades de la polimerasa, NP y un vector genómico que contiene el cDNA del segmento NS con una delección (clon 23) en células HEK293T en las que se había silenciado la expresión de SFPQ/PSF y en células control. Los extractos celulares se emplearon para transcripción *in vitro* usando el mRNA de β -globina como donador de *cap*. Estos transcritos se separaron en fracciones poli A⁺ y poli A⁻ y se analizaron mediante un gel desnaturalizante de poliácridamida. Los resultados se presentan en la **Figura R13**. En los extractos en los que se

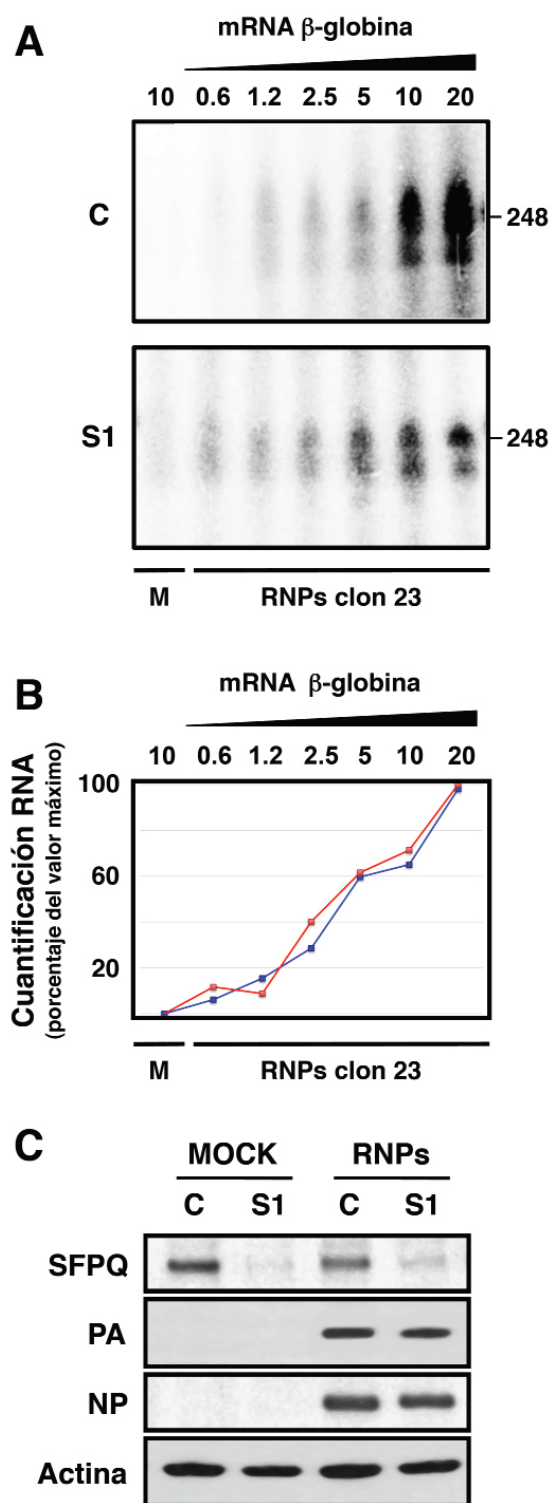


Figura R12. Transcripción *in vitro* de RNPs recombinantes en presencia de dosis crecientes de donador de *cap*. Cultivos de células humanas HEK293T se transfectaron con siRNAs control (C) o siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1). Una vez se comprobó que la expresión de SFPQ/PSF había sido silenciada, se transfectaron los cultivos con plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa, NP y un vector genómico que expresa el segmento de RNA de NS deletado (clon 23) en polaridad negativa. Como control se transfectaron cultivos con plásmidos vacíos (M). Se usaron los extractos de estos cultivos para hacer un ensayo de transcripción *in vitro* en presencia de cantidades crecientes de mRNA de β -globina como donador de *cap*. Los transcritos resultantes se analizaron en un gel de poliácridamida desnaturalizante. (A) Gel de poliácridamida desnaturalizante. En la parte superior del gel se muestran las concentraciones de mRNA de β -globina usado como donador de *cap* (μ g/ml). En la parte derecha se indica la posición del marcador del genoma del clon 23 (248 nt). (B) Cuantificación de los datos del gel del apartado A. Los datos se indican como porcentaje del valor máximo en cada serie. Línea azul: extracto de células transfectadas con los siRNAs control. Línea roja: extracto de células transfectadas con los siRNAs específicos de SFPQ/PSF. (C) El silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF se verificó mediante *Western-blot* usando anticuerpos específicos y actina como control de carga. El nivel de expresión de PA y NP también se determinó mediante *Western-blot*.

silenció la expresión de SFPQ/PSF se observó una reducción en la cantidad de RNAs poliadenilados con el consiguiente aumento de RNAs virales en la fracción de RNAs no poliadenilados (**Figura R13A**).

La cuantificación de 5 experimentos independientes indica que la cantidad total de transcrito sintetizado no varía en el contexto del silenciamiento de SFPQ/PSF respecto al control pero que la cantidad de RNAs de la fracción poli A⁺ se reduce de 4 a 5 veces (**Figura R13B**). Se obtuvieron resultados similares cuando se usó otra secuencia de siRNA para silenciar la expresión de SFPQ/PSF (datos no mostrados). Una considerable fracción de transcritos de la fracción poli A⁻ presentaron un tamaño inferior al del molde. Este resultado se puede explicar por una degradación de RNAs cuando no están estabilizados por la cola de poli-A o por una terminación prematura de la transcripción. Es interesante destacar que el perfil de los RNAs de la fracción poli A⁻ es muy similar en células en

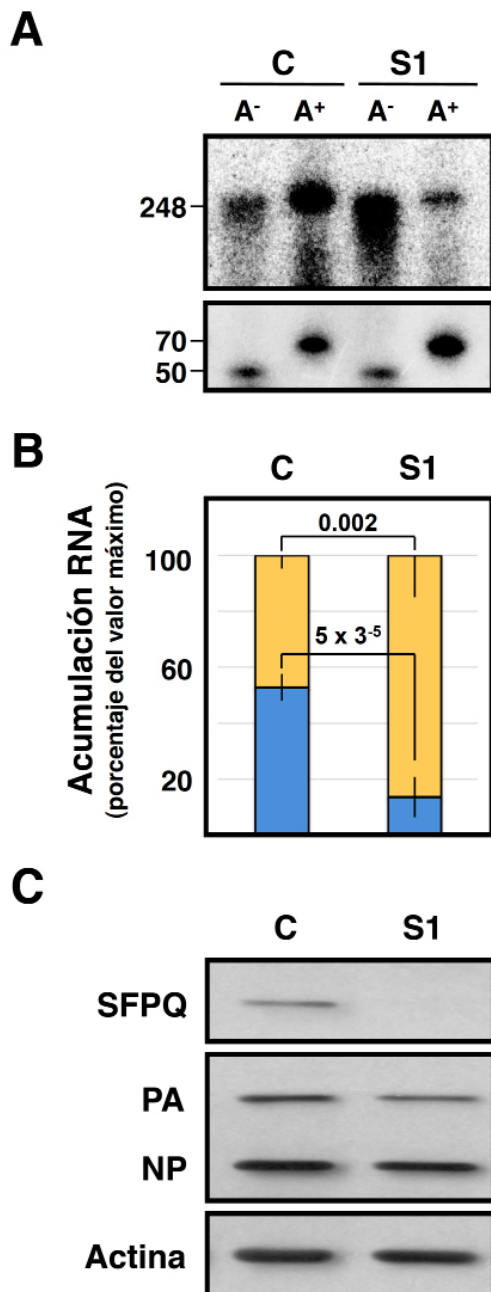


Figura R13. Estudio de la dependencia de SFPQ/PSF para la poliadenilación de los transcritos virales *in vitro*. Se generaron RNPs recombinantes en células humanas HEK293T transfectadas con siRNAs control (C) o con el siRNA-1 específico de SFPQ/PSF (S1) tal y como se indica en la leyenda de la Figura 11. Los transcritos se separaron en poliadenilados (fracción poli A⁺) y no poliadenilados (fracción poli A⁻). Se usaron oligonucleótidos poliadenilados (70 nt) y no poliadenilados (50 nt) como marcadores de recuperación y las fracciones obtenidas se analizaron en geles de poliácridamida desnaturizantes. (A) Resultados de un experimento representativo de 5 experimentos independientes. A la izquierda se indican las posiciones del marcador del genoma del clon 23 (248 nt) así como el tamaño de los marcadores de recuperación. (B) Cuantificación de la proporción de transcritos de la fracción poli A⁺ (azul) y poli A⁻ (amarillo) después de normalizar por la eficiencia de recuperación. Los datos representan las medias y las desviaciones estándar de 5 experimentos independientes. La significación de los resultados se calculó con el test de la T de *Student*. (C) El silenciamiento de la expresión de SFPQ/PSF se controló mediante *Western-blot* usando actina como control de carga. El nivel de expresión de PA y NP también se determinó mediante *Western-blot*.

4.3 Dependencia de la secuencia de la señal de poliadenilación de gripe en la función de SFPQ/PSF durante la transcripción viral

Datos previos indican que la poliadenilación de los mRNAs de gripe tiene lugar por una copia reiterada de un segmento de uridinas localizado cerca del 5' del molde de vRNA (Li y Palese, 1994; Luo y col., 1991; Poon y col., 2000; Robertson y col., 1981b). Por otro lado se ha descrito que la proteína SFPQ/PSF purificada se une de forma específica a secuencias de poli-U pero no de poli-A, C o G (Patton y col., 1993). Teniendo estos datos en consideración, es posible que SFPQ/PSF además de asociarse con la polimerasa viral (Jorba y col., 2008), se asocie con la señal de poliadenilación para promover la copia reiterada de la polimerasa viral en esa secuencia. Para probar esta hipótesis, se transfectaron cultivos de células humanas HEK293T con un siRNA

las que la expresión de SFPQ/PSF está silenciada y en células control. Este resultado sugiere que la reducción de los transcritos en la fracción poli A⁺ que se observa cuando SFPQ/PSF está silenciado no se debe a un problema en la elongación de la transcripción sino más probablemente a un problema en la poliadenilación de los mRNA virales.

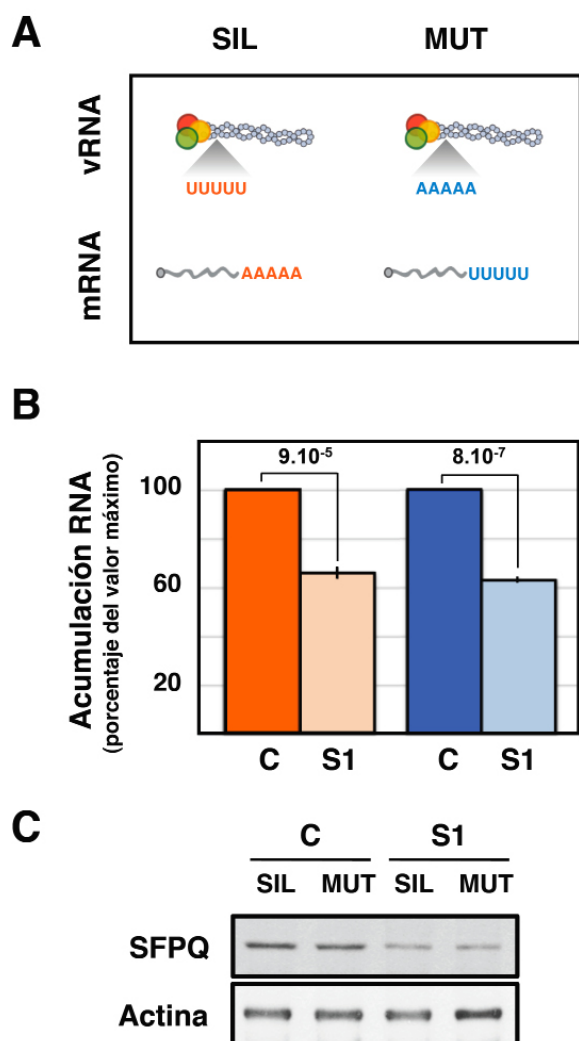


Figura R14. Estudio de la dependencia de la secuencia de la señal de poliadenilación de gripe en la función de SFPQ/PSF. Cultivos de células humanas HEK293T se transfectaron con siRNAs control (C) o siRNAs específicos de SFPQ/PSF (S1). Una vez se comprobó que la expresión de SFPQ/PSF había sido silenciada, se transfectaron con los plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa viral y NP, así como el plásmido genómico que expresa el gen pseudoviral que contiene el gen *cat* en polaridad negativa con la señal de poliadenilación silvestre (naranja) o mutada (azul). Como control, los cultivos se transfectaron con plásmidos vacíos. A las 24 horas post-transfección, se prepararon extractos totales de células y se aisló el RNA total de las muestras. (A) Representación esquemática del abordaje experimental. Se muestran las RNPs-CAT con la secuencia de poliadenilación silvestre (naranja) o con la señal de poliadenilación mutada (azul), así como el mRNA al que darían lugar tras el proceso de transcripción. (B) La acumulación del RNA de hebra positiva se determinó por hibridación con sondas específicas de *cat* y se presentan como porcentaje del valor máximo. (C) El nivel de silenciamiento de SFPQ/PSF se controló por *Western-blot* usando anticuerpos específicos de SFPQ/PSF y se usó actina como control de carga.

específico de SFPQ/PSF o inespecífico como control y posteriormente se transfectaron plásmidos que codificaban las tres subunidades de la polimerasa, NP y un plásmido genómico que contiene el gen *cat* en polaridad negativa flanqueado por las secuencias conservadas del segmento NS, con la señal de poliadenilación silvestre (poli-A) o mutada (poli-U). Las RNPs reconstituídas con el vector genómico con la señal de poliadenilación mutada, en vez de sintetizar mRNAs poliadenilados sintetizaran mRNAs poliuridinilados (Poon y col., 2000).

Se aisló el RNA total de las células y se usó para determinar la acumulación de mRNAs con cola de poli-A o poli-U mediante hibridación con sondas

específicas (Tabla M2). Como se muestra en la **Figura R14**, se observó una reducción similar en la acumulación tanto de mRNAs poliadenilados como poliuridinilados cuando se silenció la expresión de SFPQ/PSF respecto a la acumulación en células control. Cabe destacar que en términos absolutos hay menos RNA poliuridinilado que poliadenilado en las células control tal y como se había descrito previamente (Poon y col., 2000). Estos resultados sugieren que la función de SFPQ/PSF en la terminación de la transcripción de los mRNAs virales es independiente de la secuencia de la señal de poliadenilación.

Identificación de compuestos inhibidores de la replicación y/o expresión génica del virus de la gripe

La periodicidad de las pandemias causada por gripe, su capacidad de propagarse y la alta transmisibilidad del virus le convierten en un problema de salud pública. Se han generado antivirales para combatir al virus pero éste ha desarrollado resistencias por tanto, se requiere la identificación de nuevos antivirales para controlar la enfermedad.

1. Generación de un sistema de replicón para el rastreo de compuestos inhibidores del virus de la gripe

1.1 Utilización de un sistema de reconstitución de RNPs virales basado en la expresión de la proteína GFP

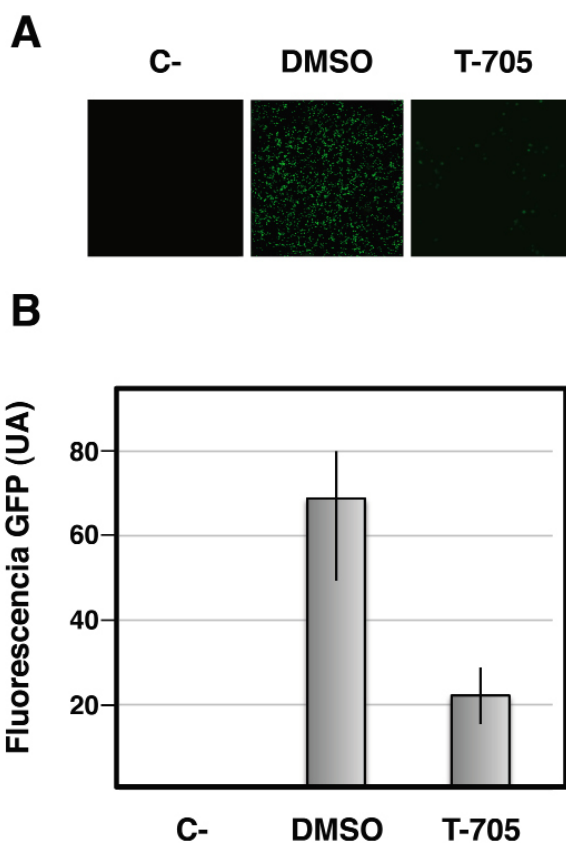
Con el objetivo de identificar compuestos químicos que inhibiesen específicamente los pasos de replicación y expresión génica se decidió usar un ensayo de replicón de RNPs. De esta forma se pretendió trabajar con un sistema más sencillo que la infección pero que mimetizase los procesos que tienen lugar en el núcleo de una célula infectada (Mena y col., 1996; Ortega y col., 2000). Para establecer un sistema de replicón basado en GFP se clonó el cDNA de la proteína EGFP en polaridad negativa, flanqueado por las secuencias conservadas del segmento NS en el plásmido pHH21. Se co-transfectaron cultivos de células HEK293T con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa, NP y el vector genómico pHH21-EGFP. El aspecto de estos cultivos transfectados se muestra en la **Figura R15A** (DMSO) en una imagen tomada a los 5 días post-transfección, momento en el que se obtuvieron los mayores niveles de fluorescencia. Como se puede observar, la mayoría de las células expresaron niveles de GFP fácilmente detectables

indicando, que la eficiencia de reconstitución de RNPsGFP fue muy alta.

1.2 Adaptación del sistema de replicón para hacer un rastreo de compuestos a media escala

Para utilizar el sistema de replicón en un rastreo de compuestos a media escala se adaptó a un formato de placa de 96 pocillos. Para ello se determinaron las cantidades óptimas de los plásmidos a transfectar, los volúmenes a usar y el tiempo de incubación. Como control positivo de inhibición de fluorescencia se trataron las células con el compuesto favipiravir (T-705), el único inhibidor de la polimerasa viral que hasta la fecha ha llegado a fase III de desarrollo clínico en humanos (Furuta y col., 2013). Un ejemplo de los resultados obtenidos en este formato se muestra en la **Figura R15A**. Como se puede observar, el nivel de fondo es muy bajo (C-), la señal del control positivo es claramente detectable (DMSO) y esta señal disminuye considerablemente cuando se añade al cultivo el inhibidor control (T-705). La cuantificación de estas señales (**Figura R15B**) indica que el sistema permitiría detectar actividades inhibitorias de la señal de GFP.

La cuantificación de la señal de fluorescente se llevó a cabo usando el microscopio *Leika* DMI 6000B. Para determinar los parámetros básicos de calidad del proceso de rastreo se llevaron a cabo múltiples réplicas de células que expresaban RNPsGFP en las condiciones previamente optimizadas y células en las que no se transfectó el plásmido que codifica la subunidad PB1, como control negativo. Se determinaron los valores medios de fluorescencia, las desviaciones estándar, el factor de reproducibilidad, el coeficiente de variación, la relación señal/ruido y la relación señal/fondo y los datos obtenidos se presentan en la **Figura R15C**. Al comparar estos valores con los obtenidos de publicaciones de referencia (Ortigoza y col., 2012)



μ_{pos}^a	$\Sigma(n_{pos1}+n_{pos2}+\dots+n_{posn})/n_{pos}$	2,49x10⁵
μ_{neg}^b	$\Sigma(n_{neg1}+n_{neg2}+\dots+n_{negn})/n_{neg}$	7,61x10⁴
δ_{pos}^c	$[\Sigma(\mu_{pos}^2)/(n-1)]^{1/2}$	2,53x10⁴
δ_{neg}^d	$[\Sigma(\mu_{neg}^2)/(n-1)]^{1/2}$	5,71x10³
Z^e	$1-((3\delta_{pos}+3\delta_{neg})/(\mu_{pos}-\mu_{neg}))$	0,46
$\%CV^f$	$\delta_{pos}/\mu_{pos} \cdot 100$	10,1%
S/B^g	μ_{pos}/μ_{neg}	3,27
S/N^h	$(\mu_{pos}-\mu_{neg})/((\delta_{pos})^2+(\delta_{neg})^2)^{1/2}$	6,66

se concluye que el sistema optimizado para el rastreo tiene estándares de calidad adecuados. Una vez se pusieron a punto las condiciones experimentales, se sometió el sistema a un ensayo aleatorio controlado con el objetivo de evitar el sesgo del investigador en la asignación de los candidatos a antiviral. Este

Figura R15. Control de calidad del sistema de reconstitución de RNPsGFP para la búsqueda de compuestos inhibidores de la replicación y/o expresión génica del virus de la gripe. Se cultivaron células humanas HEK293T en placas de 96 pocillos y se usaron para reconstituir RNPsGFP. Estos cultivos fueron tratados con DMSO o con el inhibidor de la polimerasa viral T-705. Como control se llevaron cultivos en los que no se transfectó el plásmido que codifica para la subunidad PB1 de la polimerasa viral (C-). (A) Imágenes de fluorescencia. (B) Cuantificación de la señal de fluorescencia de GFP de las imágenes del apartado A, en unidades arbitrarias (UA). (C) Parámetros de calidad del rastreo. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de la señal de GFP determinados en los cultivos control (μ_{neg} y δ_{neg}) y en los cultivos en los que se reconstituyeron RNPsGFP (μ_{pos} y δ_{pos}). Estos valores fueron usados para calcular la reproducibilidad (Z), el coeficiente de variación (CV), la relación señal/fondo (S/B) y la relación señal/ruido (S/N) mediante las fórmulas especificadas en la tabla.

estudio consistió en un ensayo de doble ciego en el que además del analista se requería la participación de otro sujeto que añadiese el compuesto T-705 al azar en placas de 96 pocillos que contenían células que expresaban RNPsGFP. Tras el procesamiento de las imágenes, el analista pudo identificar con éxito los pocillos en los que se añadió el compuesto (datos no mostrados).

2. Rastreo de potenciales inhibidores de la infección por el virus de la gripe

2.1 Descripción de la librería y diseño del rastreo de compuestos

Se decidió usar la librería NCC del NIH formada por 727 compuestos químicos. Esta librería tiene la particularidad de que se conoce el perfil de toxicidad en humanos de los compuestos químicos que la componen ya que todos ellos han sido aprobados para su uso en terapia clínica cubriendo un amplio rango de enfermedades. La concentración de compuestos que se añadió a los cultivos celulares (50 μ M) se seleccionó usando el siguiente criterio:

que menos del 20 % de los compuestos fueran tóxicos para las células en esas condiciones y que menos del 10 % inhibiesen la señal de GFP. Los cultivos de células que expresaban las RNPsGFP fueron incubados durante 5 días con los compuestos a 37°C, tras este tiempo se procedió a la toma de imágenes de los pocillos con el microscopio *Leica LAS AF* y a la cuantificación de la señal de GFP con el programa *Image J*. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la **Figura R16**. Se consideraron compuestos candidatos aquellos que redujeron la señal de GFP en el rango del compuesto de referencia, T-705 (triángulos de la **Figura 16**). Aquellos compuestos que bajaron la señal de GFP a nivel de fondo (asteriscos de la **Figura 16**) podrían ser inhibidores muy eficientes o también compuestos tóxicos. Para distinguir entre estos dos tipos de compuestos, se procedió a evaluar de manera preliminar la toxicidad de cada compuesto mediante observación de los cultivos en el microscopio óptico. Tras este análisis combinado de eficiencia inhibitoria y observación de la biomasa celular se identificaron 196 compuestos que redujeron la eficiencia de replicación de las RNPsGFP en ausencia de toxicidad aparente (**Figura R17**).

2.2 Búsqueda de compuestos que no presenten toxicidad y bloqueen de forma específica los procesos de replicación y/o expresión génica virales

Para descartar los posibles falsos positivos, se repitió el rastreo en las mismas condiciones con los 196 compuestos candidatos. Los compuestos que, en esta nueva validación, volvieron a reducir la señal de GFP, se usaron para llevar a cabo un contra-rastreo pero en este caso la expresión de GFP dependía de un promotor de RNA polimerasa II (pCAGGS-GFP). Se optimizó la cantidad de plásmido pCAGGS-GFP que había que transfectar

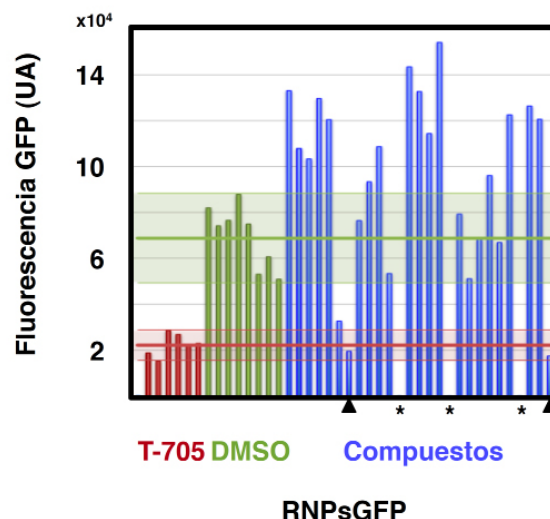
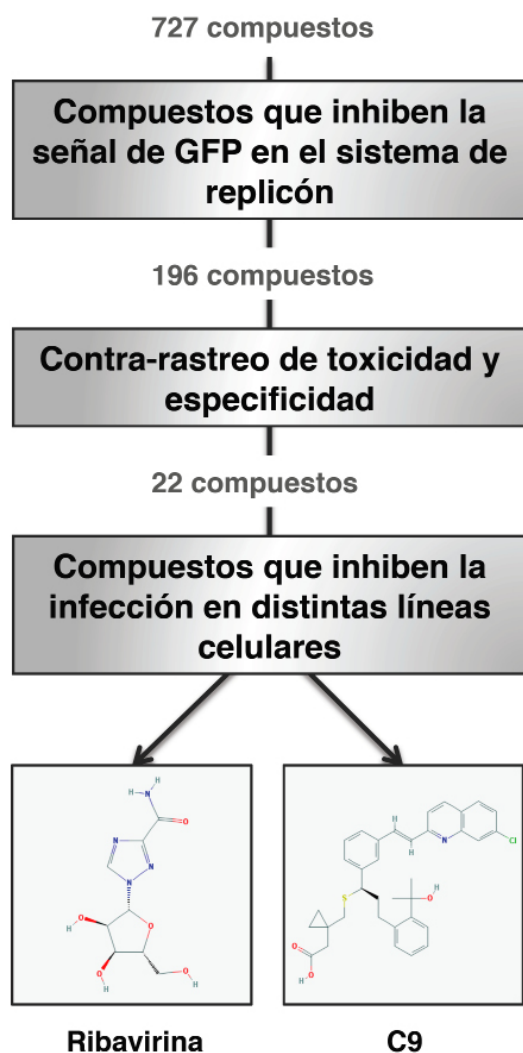


Figura R16. Método de selección de compuestos candidatos a inhibidores de la replicación/ expresión génica del virus de la gripe. Se cultivaron células humanas HEK293T en placas de 96 pocillos y se usaron para reconstituir RNPsGFP. A estos cultivos se añadió DMSO (8 pocillos), el inhibidor de la polimerasa viral T-705 (6 pocillos) o los compuestos químicos de la quimioteca (un pocillo por compuesto). Se representa la cuantificación de la señal de fluorescencia de GFP de las imágenes tomadas en cada pocillo en unidades arbitrarias (UA). Se representa la media de la señal de fluorescencia (línea gruesa) y la desviación estándar (líneas finas) de los pocillos con DMSO (verde) o con T-705 (rojo). Se indican los compuestos que bajan la intensidad de fluorescencia en el rango del T-705 usado como referencia (triángulos) y los que la reducen a nivel de fondo (asteriscos).

para que la señal de fluorescencia de GFP fuese similar a la obtenida en el sistema de reconstitución de RNPsGFP. Los compuestos que inhibieron la expresión de GFP en el sistema dependiente del promotor de la RNA polimerasa II fueron considerados inespecíficos o tóxicos y por tanto fueron descartados como candidatos. Algunos de los compuestos que en el primer rastreo inhibieron la señal fluorescente por debajo del T-705 (asteriscos de la **Figura R16**) también se evaluaron en este contra-rastreo pero con dosis decrecientes. Se probó la eficacia como antivirales en el contexto



de la infección por el virus de la gripe de los 22 compuestos que inhibieron la expresión de GFP en el sistema de RNPsGFP pero no en el de pCAGGS-GFP, usando las cepas VIC y WSN. Para ello, se infectaron a baja multiplicidad cultivos de células humanas (A549 y Huh-7), de mono (LLCMK2) y de ratón (3T3) y a las 48 horas post-infección se recogieron los sobrenadantes. Se calculó el título viral mediante un ensayo de formación de placa en células MDCK (datos no mostrados). Tras el rastreo sólo hubo dos compuestos que redujeron la producción de virus de la gripe en todas las líneas celulares. Uno de ellos fue la Ribavirina, inhibidor conocido del virus de la gripe (Sidwell y col., 1995) y el otro fue el compuesto C9 con el que se continuó el análisis. El esquema que resume todo el proceso

Figura R17. Diagrama del rastreo de compuestos y resumen de resultados. Se cultivaron células humanas HEK293T en placas de 96 pocillos en las que se reconstituyeron RNPsGFP. Se añadieron individualmente en cada pocillo uno de los 727 compuestos procedentes de una librería del NIH. De ellos, 495 compuestos no alteraron la señal de GFP, 36 compuestos potenciaron la señal de GFP y 196 compuestos la redujeron. Estos últimos fueron considerados inhibidores potenciales del virus de la gripe y con ellos se continuó el rastreo. Para el segundo paso del rastreo cultivos paralelos de células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido pCAGGSGFP o bien se usaron para reconstituir RNPsGFP. Sobre estos cultivos se añadieron los compuestos candidatos. Sólo 22 de estos compuestos redujeron la señal de GFP en los cultivos en los que se reconstituyeron RNPsGFP. El resto resultaron tóxicos o inespecíficos. A continuación se probaron estos 22 compuestos en distintos tipos celulares infectados con las cepas VIC o WSN del virus de la gripe y sólo dos de ellos redujeron el título viral en todas las líneas celulares utilizadas. Estos compuestos fueron la Ribavirina y el compuesto C9 con el que se siguió la caracterización. Se muestran las estructuras químicas de ambos compuestos.

de rastreo se puede observar en la **Figura R17**.

2.3 Identificación del compuesto seleccionado C9 en las bases de datos y estudio de su perfil farmacológico

El compuesto C9 (CID 23663996) corresponde al principio activo *Montelukast sodium* que es comercializado por MERCK con el nombre de *Singulair*. Su modo de acción consiste en antagonizar el receptor de leucotrienos. Los leucotrienos son unos ácidos grasos que producen la constricción de la musculatura lisa del aparato respiratorio y el estrechamiento de las vías respiratorias. Por este motivo, este fármaco se usa para prevenir ataques de asma y evitar la constricción de los bronquiolos producida por el ejercicio. Además se usa para tratar los síntomas de alergias perennes y estacionales. El hecho de que este fármaco tenga su diana en las células pulmonares y que no muestre

toxicidad a altas dosis tanto en modelos animales como humanos (MERCK, 2010) le convierten en un antigripal potencial muy atractivo.

3. Caracterización del compuesto C9 en células humanas

Antes de comenzar con la caracterización del compuesto como antiviral, éste se obtuvo de otra casa comercial y se verificó mediante espectrometría de masas que la composición elemental del nuevo compuesto y del procedente de la quimioteca del NIH era la misma (**Figura R18**). Para ello, los compuestos fueron irradiados con una láser pulsado YAG a 355 nm y mediante la aplicación de un campo eléctrico los fragmentos resultantes fueron ionizados y se separaron de acuerdo con su relación masa/carga. La comparación de los espectros de masas obtenidos del compuesto C9 del NIH (**Figura R18A**) y de AKOS GmbH (**Figura R18B**) revela que ambas moléculas comparten la misma estructura química.

3.1 Determinación de la toxicidad y de la eficacia del compuesto C9 en células pulmonares humanas

Una vez se comprobó que la estructura química del compuesto C9 obtenido de AKOS GmbH era la correcta, se estudió la toxicidad y la eficacia del compuesto C9 como antiviral calculando los parámetros de CC_{50} e IC_{50} , indicadores de la toxicidad y de la efectividad del compuesto, respectivamente. Para calcular la toxicidad del compuesto se recurrió al clásico ensayo metabólico de viabilidad MTT. Para ello, se añadieron concentraciones crecientes del compuesto sobre cultivos de células A549 en pocillos de M96 y se incubaron durante 48 horas. Tras este tiempo se calculó el porcentaje de viabilidad celular respecto al cultivo de células sin compuesto. Esta representación (**Figura R19A**)

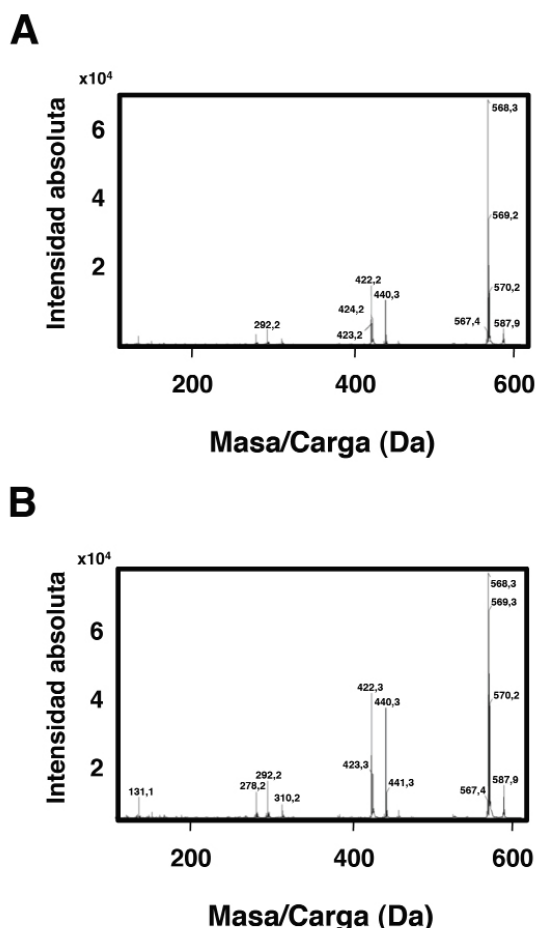


Figura R18. Espectro de masas del compuesto C9 obtenido de dos casas comerciales. Se analizó la huella nucleotídica del compuesto C9 obtenido de la librería del NIH (A) y de AKOS GmbH (B) mediante MALDI-TOF/TOF. Los picos representados corresponden a los fragmentos ionizados del compuesto C9 generados por irradiación laser y separados en función de su relación masa/carga en un espectrómetro de masas. as químicas de ambos compuestos.

permitió determinar un valor de 50 μ M para el parámetro de CC_{50} .

Para calcular la efectividad del compuesto se usaron dos ensayos alternativos. (i) Por un lado se infectaron células A549 a baja multiplicidad de infección en presencia de distintas concentraciones de compuesto y a las 48 horas post-infección se usaron los sobrenadantes de las células infectadas para calcular el título viral mediante ensayo de placa en células MDCK. Los resultados se presentan en la

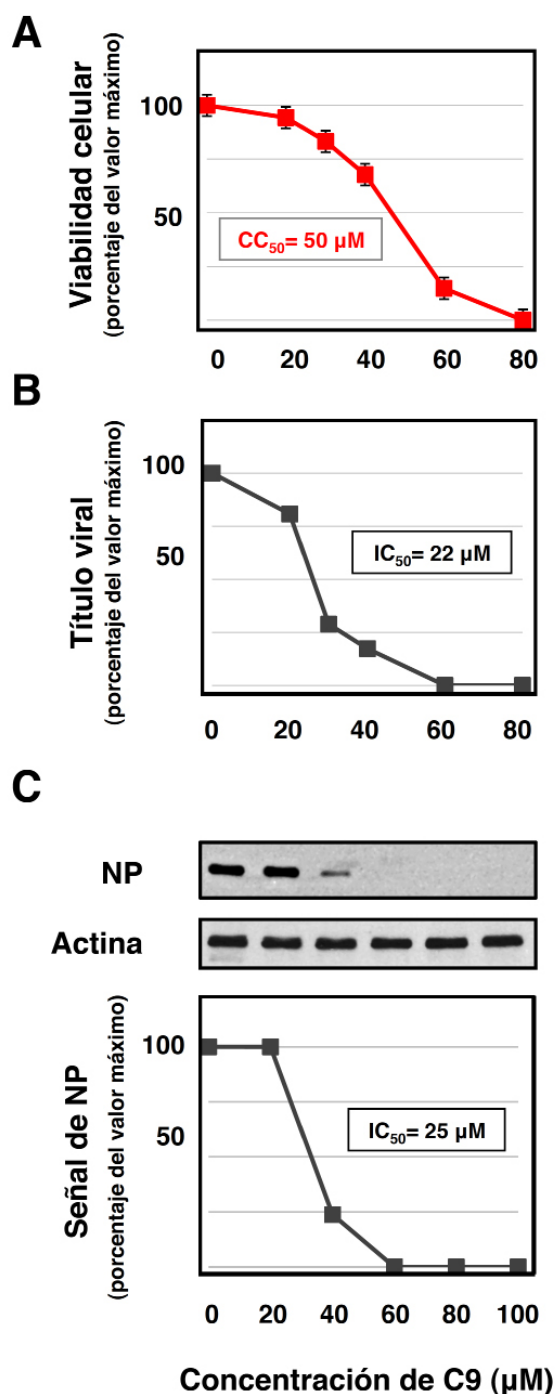


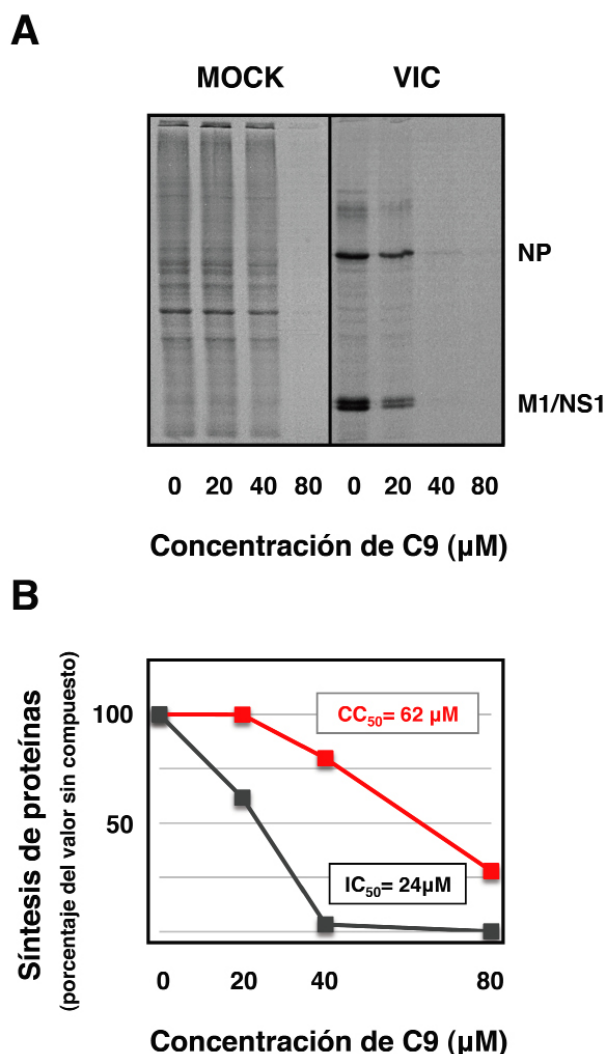
Figura R19B. Se representó el porcentaje del título viral respecto a los cultivos infectados sin compuesto. Esta representación permitió calcular que la IC₅₀ del compuesto en células A549 fue 22 μM. (ii) Otro método alternativo para medir la efectividad del compuesto consistió en determinar la acumulación de NP en presencia del compuesto C9. Para ello se infectaron células A549 a alta multiplicidad de

Figura R19. Evaluación de la toxicidad (CC₅₀) y eficacia como antiviral (IC₅₀) del compuesto seleccionado C9. (A) Cultivos de células humanas A549 fueron tratadas con las concentraciones de compuesto C9 indicadas y tras 48 horas se midió la actividad mitocondrial de las células por medio del ensayo de viabilidad MTT. La representación gráfica de estos valores permitió calcular la CC₅₀. (B) Cultivos de células humanas A549 fueron infectadas a una multiplicidad de 0.001 ufp/célula con la cepa VIC y tratadas con las concentraciones de compuesto C9 indicadas. A las 48 horas post-infección se recogieron porciones de sobrenadantes de las células infectadas y se usaron para determinar el título viral mediante ensayo de formación de placa. Los valores se representan como porcentaje respecto al título viral en células sin compuesto. Esta representación permitió calcular la IC₅₀ del compuesto. (C) Cultivos de células humanas A549 fueron infectadas a una multiplicidad de 3 ufp/célula y tratadas con las concentraciones de compuesto C9 indicadas. A las 6 horas post-infección se recogieron los extractos de células totales y se analizó la acumulación de NP y de actina mediante *Western-blot* usando anticuerpos específicos. Los valores de la cuantificación de la señal de NP se representan en porcentaje respecto a la señal de NP en células infectadas sin compuesto. Esta representación permitió determinar la IC₅₀ del compuesto.

infección en presencia de distintas concentraciones de compuesto y a las 6 horas post-infección se analizó la acumulación de la proteína NP mediante *Western-blot* usando actina como control de carga (**Figura R19C**). Se cuantificó la señal de NP cuando ésta se encontraba en un rango lineal mediante el programa *Image J* y se representó el porcentaje de la señal de NP respecto a los cultivos infectados sin compuesto. Esta representación permitió calcular que la IC₅₀ del compuesto en células A549 fue 25 μM. Usando ambas estrategias la IC₅₀ del compuesto fue muy similar.

3.2 Efecto del compuesto C9 en la síntesis de proteínas virales y celulares

El siguiente paso fue distinguir si la bajada en la acumulación de la proteína NP en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (**Figura**



R19C) era debida a una bajada en su síntesis. Para ello, se infectaron cultivos de células A549 a alta multiplicidad de infección y a las 6 horas post-infección se estudió la síntesis de proteínas virales y celulares mediante un marcaje metabólico de proteínas. Se observó una bajada del 40 % en la síntesis de proteínas virales en presencia de 20 μM del compuesto (**Figura R20A**). Esta concentración no provocó ninguna alteración aparente en la síntesis de proteínas celulares. Este resultado indica que el compuesto C9 inhibe la síntesis de proteínas virales a concentraciones subtóxicas aunque no se puede discriminar si se trata de un efecto directo en la síntesis de proteínas o si afecta a la síntesis de mRNAs virales.

Figura R20. Cinética de la síntesis de proteínas virales y celulares en células humanas tratadas con distintas concentraciones de C9. Se infectaron cultivos de células humanas A549 con el virus VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula. A las 6 horas post-infección los cultivos fueron incubados con ^{35}S -Met/Cys durante 1 hora. Tras el marcaje, se analizaron los extractos totales de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía. (A) Autoradiografía de geles de poliacrilamida desnaturalizante de células sin infectar (MOCK) o infectadas (VIC) en presencia de las concentraciones indicadas de compuesto C9. La movilidad de algunas proteínas virales se indica en la parte derecha (NP y M1/NS1). (B) Cuantificación de la señal de los geles del apartado A. En rojo: cuantificación de la síntesis de proteínas celulares (MOCK) en presencia de concentraciones crecientes de C9. En gris: cuantificación de la señal de la síntesis de proteínas virales en células infectadas (VIC) en presencia de distintas concentraciones de compuesto. La representación gráfica de estos valores permitió determinar la CC_{50} e IC_{50} del compuesto cuyo valor se indica en la figura.

Para saber si el compuesto C9 afectaba a la transcripción viral se determinó la acumulación de mRNAs virales procedentes de la transcripción primaria y de la transcripción secundaria en células infectadas en presencia o ausencia del compuesto C9.

3.3 Efecto del compuesto C9 en la acumulación de mRNAs del virus de la gripe

Se infectaron cultivos de células A549 a alta multiplicidad con la cepa VIC en presencia o ausencia de cicloheximida. La cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas que son esenciales para llevar a cabo los procesos de replicación viral. Por tanto, en presencia de cicloheximida sólo se detectan aquellos mRNAs virales que proceden de la transcripción primaria del virus de la gripe y en ausencia de cicloheximida se detectan los mRNAs virales procedentes mayormente de la transcripción secundaria. La acumulación de mRNAs de NP se determinó mediante RT-qPCR usando sondas específicas y el resultado se muestra en la **Figura**

R21. Este resultado demuestra que la adición del compuesto C9 no afecta a la transcripción del segmento NP del virus de la gripe.

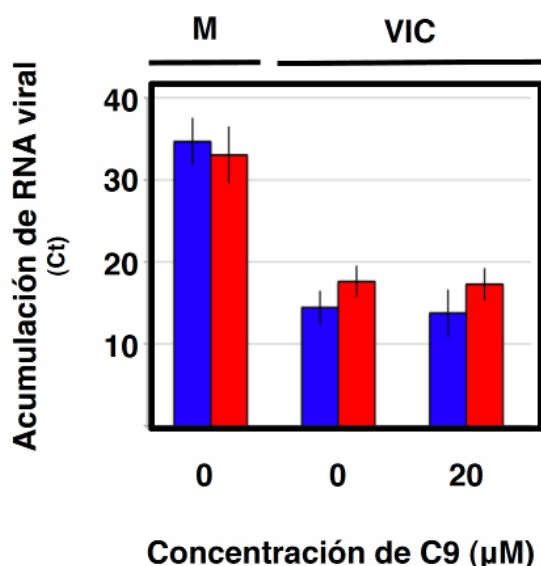


Figura R21. Acumulación de mRNA durante la infección del virus de la gripe en células en las que se añadió compuesto C9. Cultivos de células humanas A549 fueron infectados con la cepa VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula durante 6 horas en presencia (rojo) o ausencia (azul) de cicloheximida (100 μg/ml) y las concentraciones indicadas de compuesto C9. La acumulación del RNA viral se determinó mediante RT-qPCR usando sondas específicas para el segmento NP. Se determinó la significación del experimento mediante el test T de *Student*. Se presenta la media y la desviación estándar de 4 determinaciones independientes de la acumulación de RNA viral en células sin infectar (MOCK) o infectadas (VIC) en presencia de 20 μM de compuesto C9 o de la cantidad correspondiente de DMSO.

3.4 Efecto del C9 en la actividad transcripcional *in vitro* de las RNPs virales

Para verificar que el compuesto C9 no tiene un efecto sobre la transcripción de las RNPs virales mediante un abordaje alternativo, se generaron RNPs recombinantes mediante transfección de

los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa viral, NP y un vector genómico que contiene el cDNA del segmento NS con una delección (clon 23) en células HEK293T. Los extractos celulares de estas células se usaron para llevar a cabo un ensayo de transcripción *in vitro* usando el mRNA de β-globina como donador de *cap* y en presencia del compuesto C9 resuspendido en DMSO o de la cantidad de DMSO correspondiente (DMSO 25). Los resultados se muestran en la **Figura R22** en los que se observa un aumento en la síntesis de RNA viral en presencia de C9. Este aumento en la síntesis de RNA viral no es específico sino que es debido a la adición de DMSO a la reacción (comparar la señal de 25 y DMSO 25 de la **Figura R22B**). Este resultado indica que el compuesto C9 no afecta a la actividad transcripcional de la polimerasa viral *in vitro*.

Estos datos en su conjunto sugieren que el compuesto C9 bloquea la síntesis de proteínas virales sin que la transcripción de los mRNAs virales se vea comprometida.

4. Estudio de la efectividad antigripal del compuesto C9 en el contexto murino

El estudio de la síntesis de proteínas en presencia del compuesto C9 (**Figura R20**), también permitió calcular la CC_{50} y la IC_{50} en estas condiciones (**Figura R20B**) mediante cuantificación de las señales obtenidas. Estos valores (62 μM y 24 μM respectivamente) eran muy similares a los descritos previamente usando ensayos distintos (**Figura R19**).

Aunque el compuesto C9 mostró cierta potencia como antiviral, la ventana terapéutica (relación entre CC_{50}/IC_{50}) en células humanas es muy pequeña, de dos a tres veces aproximadamente. Afortunadamente, es importante tener en cuenta

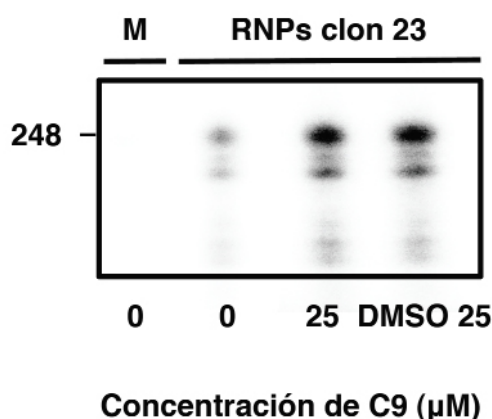
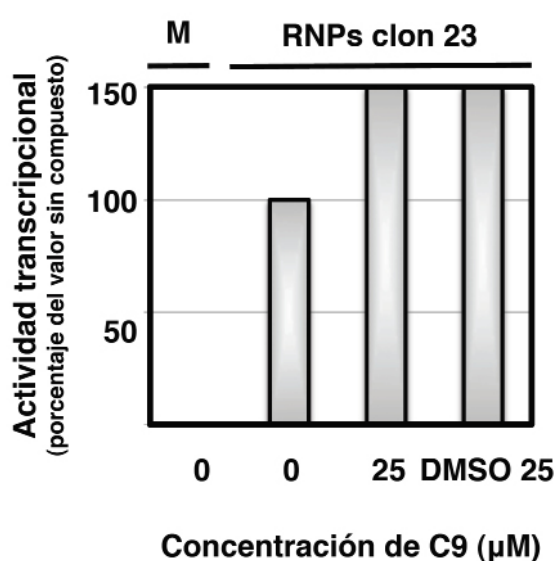
A**B**

Figura R22. Transcripción *in vitro* de RNPs recombinantes en presencia del compuesto C9. Se transfectaron cultivos de células humanas HEK293T con plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa, NP y un vector genómico que expresa el segmento de RNA de NS deletado (clon 23) en polaridad negativa. Como control se transfectaron cultivos con plásmidos vacíos (M). Se usaron los extractos de estos cultivos para hacer un ensayo de transcripción *in vitro* empleando mRNA de β -globina como donador de *cap*. Los transcritos resultantes se analizaron por electroforesis en un gel de poliácridamida desnaturante y autoradiografía. (A) Gel de poliácridamida desnaturante. En la parte inferior del gel se muestran las concentraciones de compuesto añadido a la reacción (μ M) o la cantidad de DMSO correspondiente a 25 μ M (DMSO 25). En la parte izquierda se indica la posición del marcador del genoma del clon 23 (248 nt). (B) Se presenta la cuantificación de los datos del gel del apartado A, expresados en porcentaje respecto al valor sin compuesto.

que los perfiles toxicológicos de este compuesto han sido ampliamente estudiados en humanos y en varios modelos animales y se ha demostrado que dosis superiores a 125 veces la cantidad diaria recomendada a humanos administrada a ratones durante 14 semanas no tienen efectos tóxicos (MERCK, 2010). Teniendo en cuenta estos datos se decidió probar el posible efecto antiviral del compuesto C9 en ratones infectados con el virus de la gripe.

4.1 Ensayo preclínico del compuesto en ratones infectados con dosis letales del virus de la gripe

Con el objetivo de analizar si el compuesto C9 era eficaz como antiviral en un modelo animal se administró mediante sondas orogástricas a grupos de ratones de la cepa Balb/c ($n=6$ ratones por condición). Como control positivo se administró a otro grupo de ratones el compuesto T-705. Después de 6 horas tras la primera administración, los grupos seleccionados se inocularon intranasalmente con 2000 ufp (5-10 veces la DL_{50}) del virus pandémico A/California/07/2009. Se monitorizó diariamente el peso de los ratones durante 7 días. Todos los animales inoculados y que no recibieron tratamiento mostraron sintomatología a los dos días post-infección, que se reflejó en la pérdida de movilidad y erizamiento de pelo (datos no mostrados). Los ratones infectados perdieron peso progresivamente desde el día 3 hasta el día 7, que murieron (**Figura R23**). Sin embargo, aquellos animales inoculados y tratados con el inhibidor control (T-705) no mostraron sintomatología y presentaron un 100 % de supervivencia. Los ratones infectados y tratados con el compuesto C9, experimentaron pérdidas de peso y mortalidad similares a los ratones sin tratamiento. Estas pérdidas de peso no fueron consecuencia de la administración de cantidades tóxicas de compuesto ya que los ratones control a los que se le administró la misma cantidad de compuesto pero no

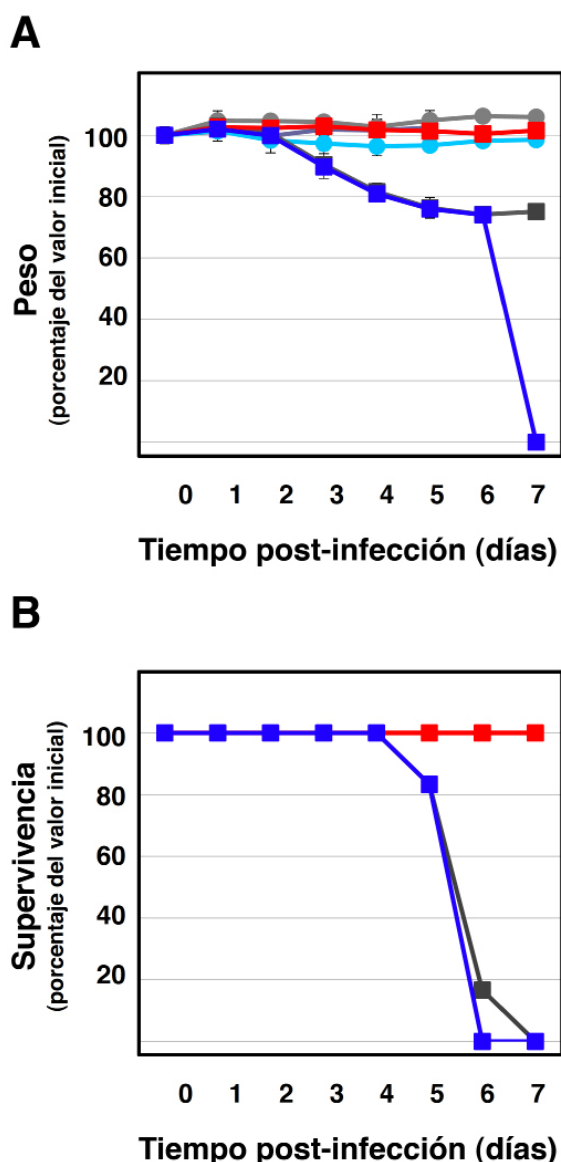


Figura R23. Eficacia terapéutica del compuesto C9 contra el virus de la gripe en un modelo animal. Se trataron 6 ratones por grupo administrándoles oralmente agua, C9 o T-705. A las 6 horas después de la administración del tratamiento se infectaron los ratones intranasalmente con 5-10 LD₅₀ del virus de la gripe o con DMEM en los ratones control. A las 6 horas tras la infección y, posteriormente cada 12 horas, se volvieron a administrar los compuestos correspondientes a cada grupo durante 7 días y se monitorizó diariamente el peso de los ratones. (A) Representación del peso y (B) de la supervivencia de cada grupo en porcentaje respecto al valor inicial. A los grupos de ratones infectados (cuadrados) y no infectados (círculos) se les administró agua (gris), C9 (azul) o T-705 (rojo).

se infectaron presentaron una supervivencia del 100 % . Este resultado indica que, en estas condiciones el compuesto C9 no es tóxico pero no protege a los ratones de la infección por el virus de la gripe. Una posible explicación a este resultado negativo podría ser que la diana sobre la que actúa el compuesto C9 esté presente en células humanas pero no en células de ratón. Para examinar esta hipótesis se estudió la eficacia como antiviral del compuesto C9 en células de ratón.

4.2 Efecto del compuesto en la síntesis de proteínas celulares y virales en células de ratón

Se infectaron fibroblastos de ratón 3T3 a alta multiplicidad de infección y a las 6 horas post-infección se estudió la síntesis de proteínas virales y celulares mediante un marcaje metabólico de proteínas (**Figura R24**). La cuantificación de las señales resultantes permitió calcular la CC₅₀ y la IC₅₀ en estas condiciones, que fueron 36 μ M y 33 μ M respectivamente. Estos valores indican que el compuesto C9 no es efectivo como antiviral en células de ratón. Una posible explicación es que la diana sobre la que actúa el compuesto no esté conservada en células de ratón.

5. Búsqueda de la diana antiviral del compuesto C9

Para poder identificar la diana antiviral del compuesto C9 se aisló el RNA total de las células humanas infectadas a alta multiplicidad a las 6 horas post-infección en presencia de 20 μ M del compuesto C9 o de la cantidad correspondiente de DMSO. Como control se aisló el RNA de células sin infectar en presencia o ausencia del compuesto C9. Se descartó el RNA ribosómico y se analizó la secuencia del resto del RNA que incluye esencialmente mRNAs, pseudogenes, y lincRNAs, mediante secuenciación masiva. Cabe esperar que

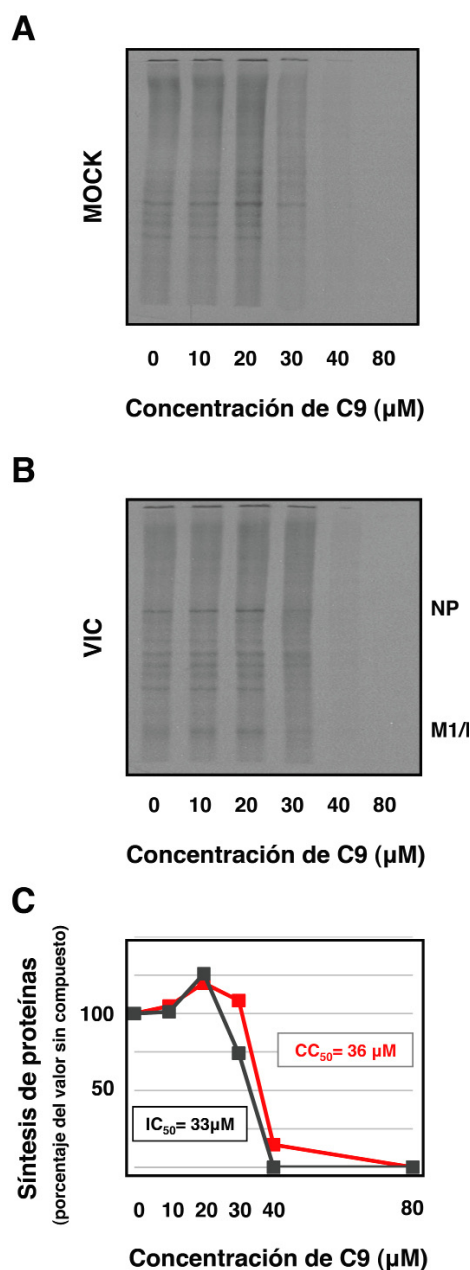


Figura R24. Cinética de la síntesis de proteínas virales y celulares en células de ratón tratadas con distintas concentraciones de C9. Se infectaron cultivos de fibroblastos de ratón 3T3 con el virus VIC a una multiplicidad de 3 ufp/célula. A las 6 horas post-infección los cultivos fueron incubados con ^{35}S -Met/Cys durante 1 hora. Tras el marcaje, se analizaron los extractos totales de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía. (A) Autoradiografía de geles de poliacrilamida desnaturizante de células sin infectar (MOCK) o infectadas (VIC) en presencia de las concentraciones indicadas del compuesto C9. (B) Cuantificación de la señal de los geles del apartado A. En rojo: cuantificación de la síntesis de proteínas celulares (MOCK) en presencia de concentraciones crecientes de C9. En gris: cuantificación de la señal de la síntesis de proteínas virales en células infectadas (VIC) en presencia de distintas concentraciones de compuesto. La representación gráfica de estos valores permitió determinar la CC₅₀ e IC₅₀ del compuesto cuyo valor se indica en la figura.

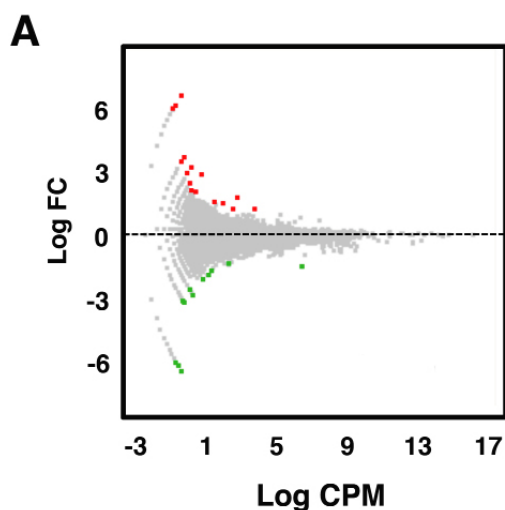
el de ratón (GRCm38) usando el programa *BWA* (Li y Durbin, 2009). Se analizó la expresión diferencial de los genes en las distintas condiciones y se consideró genes candidatos los que tenían un valor $p < 0.015$ o un $FDR < 0.05$ (cuando se comparó células infectadas frente a no infectadas).

Siguiendo estos criterios se identificaron 34 RNAs expresados diferencialmente en células infectadas y tratadas con compuesto respecto a células infectadas sin compuesto (**Tabla R1**), 18 de esos genes se sobre-expresaron en presencia del compuesto (rosa) y 13 genes se expresaron menos (verde). Para comprobar gráficamente el efecto del compuesto en la expresión diferencial de los genes se utilizó el visualizador *FIESTA* (**Figura R25A**). Con el objetivo de comparar los perfiles de expresión génica obtenidos en diferentes condiciones, se generaron diagramas de Venn con el programa *Venny* (**Figura R25B**). Como se puede ver en el diagrama hay 4 genes cuya expresión varía al añadir el compuesto C9 tanto en células sin infectar como en células infectadas. Estos genes son *ulbp1*, *chac1*, *stc2* y *klf9*. En la **Figura 24B** se representan además dos genes cuya

aquellos genes potencialmente importantes para la respuesta antiviral producida por el C9 activen o repriman su expresión en presencia del compuesto. En principio no se espera que la expresión de esos genes varíe en células de ratón, donde el compuesto C9 no tiene un efecto antiviral aparente, por lo que además, se secuenció el RNA de células de ratón en presencia o ausencia del compuesto C9. Tras confirmar, con el programa *FastQC*, que la calidad de las lecturas obtenidas era buena, éstas se alinearon con el genoma humano (GRCh37) o con

Gen	Descripción	FC
IFNA11P	pseudogen IFN alfa 11	12
DNAJC9-AS1	DNAJC9 RNA antisentido 1	>11
PPP1R27	subunidad 27 reguladora de PP1	>8
C2orf16	fase abierta de lectura 16 del cromosoma 2	>7
MINOS1P3	pseudogen	>7
HMG2P13	pseudogen 13	>7
RP4-733B9.1	pseudogen RP4	>7
KRT20	queratina 20	10
BEGAIN	proteína asociada a guanilato quinasa	10
ULBP1	UL16 proteína de unión 1	8
AC090945.1	pseudogen	6,5
CHAC1	regulador del transporte de cationes	6
MUC20	mucina 20	4,67
TBX19	T-box 19	3,50
CAPN12	calpaina 12	3,40
STC2	estaniocalcina 2	2,81
RFNG	RFNG	2,40
TXNIP	proteína de interacción con tioredoxina	2,29
IDO1	indoleamina 2,3-dioxigenasa 1	-3,30
DDX18P1	pseudogen	-4,22
BRICD5	BRICHOS	-4,86
KLF9	Kruppel	-5,6
SEMA6B	semaforina	-8
CLCN6	canal sensible a voltaje 6	-9,5
OTX1	orthodenticle homeobox 1	-12
AP000695.6	RNA antisentido	-12
RP4-673D20.3	Pseudogen	-12
TMEM229B	Proteína transmembrana 229B	-13
RP11-357C3.3	RNA antisentido	-13
RP11-293B20.2	Pseudogen	-13
HSD17B3	hidroxiesteroid (17-beta) deshidrogenasa 3	<-9
36219	E3ubiquitin protein ligase	<-9
U1	U1 spliceosomal RNA	<-9
MIR29A	microRNA 29a	<-10

Tabla R1. Genes con expresión diferencial entre células infectadas con o sin compuesto C9. Se infectaron cultivos de células humanas A549 con la cepa VIC en presencia o ausencia de 25 μ M del compuesto C9. Como control se llevaron células A549 sin infectar. A las 6 horas post-infección se extrajo el RNA total y se descartó el RNA ribosómico. Se realizó una secuenciación masiva del RNA resultante. Las lecturas obtenidas se compararon con el genoma humano y se comparó el perfil génico de cada condición analizada. Aquellos genes que mostraron una expresión diferencial en células infectadas en presencia del compuesto C9 frente a células infectadas sin compuesto aparecen representados en la tabla. En rosa se representan aquellos genes cuya expresión se ha sobre-expresado y en verde reprimido. Se destacan con letras verdes los genes que se activan cuando se añade el compuesto tanto a células infectadas como sin infectar y en azul aquellos genes cuya expresión el virus potencia y el compuesto reprime.



la infección mientras que al añadir el compuesto C9 la expresión se reduce. Estos genes constituyen vías candidatas a ser diana del compuesto C9 pero hace falta más investigación en este sentido para verificarlo.

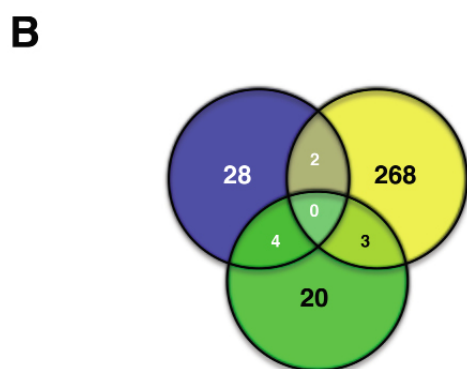


Figura R25. Análisis comparativo de los genes expresados en células infectadas y tratadas con compuesto frente a las células infectadas sin compuesto. (A) Representación gráfica usando el visualizador *FIESTA*. En rojo se representan los genes cuya expresión se ha sobre-expresado, en verde aquellos cuya expresión se ha reducido en presencia del compuesto y en gris aquellos cuya expresión no varía de una manera significativamente estadística. (B) Diagrama de *Venn* que muestra el solapamiento de los genes que se expresan diferencialmente en las condiciones analizadas. En los distintos colores se muestran los genes diferencialmente expresados: en células infectadas y en presencia del compuesto C9 frente a las células infectadas sin compuesto (azul), en células infectadas frente a no infectadas (amarillo) y en células no infectadas en presencia del compuesto frente a células no infectadas sin compuesto (verde).

expresión varía tanto al infectar células como al tratar células infectadas con el compuesto C9. Estos genes son *idol* y U1 snRNA y sorprendentemente la expresión de ambos genes es potenciada durante

DISCUSIÓN

Han pasado 30 años desde que se sabe que el virus de la gripe transcribe y replica en el núcleo celular (Bouloy *et al.*, 1978). Durante este tiempo se ha hecho un espectacular avance para desentrañar el mecanismo molecular de la síntesis de RNA por parte de las RNPs desde un punto de vista genético, bioquímico y estructural. Sin embargo, estas complejas reacciones no serían posibles sin la colaboración de numerosos factores celulares asociados a las RNPs. Por este motivo, en los últimos años se ha profundizado en la identificación y caracterización de las vías celulares importantes para la infección. Ensayos de interacción y silenciamiento por RNA interferente a gran escala han proporcionado una amplia lista de factores asociados a proteínas virales relevantes para la regulación de las actividades que lleva a cabo la polimerasa viral. Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo molecular de acción de la mayoría de estos factores celulares.

Un mayor conocimiento de las interacciones entre el virus y la célula infectada supondría un avance importante para llevar a cabo un cambio de paradigma en la terapia antigripal ya que los antivirales disponibles en la actualidad tienen como diana proteínas virales pero con el paso de los años cada vez hay más compuestos empleados en ensayos pre-clínicos que tienen como diana vías celulares que directa o indirectamente son importantes para la multiplicación viral. Estos nuevos abordajes son muy prometedores particularmente respecto a la prevención de resistencias virales, que constituyen en la actualidad el mayor problema en la terapia antigripal.

Dos estrategias para identificar nuevas vías celulares importantes para la replicación y expresión génica viral

1. Proteómica de la polimerasa viral: una estrategia descriptiva

A lo largo de los años se han llevado a cabo varios abordajes para identificar las proteínas celulares que participan en las diversas funciones que se le atribuyen a la RNA polimerasa viral. Los abordajes más antiguos consistieron en ensayos de doble híbrido en levadura usando como cebo las subunidades de la polimerasa PA y PB1 (Honda *et al.*, 2007; Huarte *et al.*, 2001). Esta técnica permite la identificación de proteínas celulares que interaccionan de un modo tanto estable como transitorio pero es posible que modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales que no tienen lugar en levaduras, hagan que un determinado factor deje de ser detectable en este sistema. Otra de las estrategias que se llevaron a cabo fue el fraccionamiento bioquímico y complementación funcional *in vitro* (Momose *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1994). De esta manera se identificaron las fracciones celulares capaces de activar la síntesis viral de vRNPs purificadas de viriones. Años más tarde, varios grupos analizaron los complejos proteicos purificados por cromatografía de afinidad en combinación con técnicas de espectrometría de masas (Engelhardt *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2007). Este abordaje permite la purificación de complejos intracelulares y su caracterización. Sin embargo sólo se identifican factores asociados de un modo estable, ya que las interacciones transitorias son difícilmente detectadas. En nuestro laboratorio se llevó a cabo uno de estos análisis proteómicos mediante cromatografía de afinidad de la polimerasa viral expresada en células humanas. La identificación de los complejos purificados se llevó a cabo

mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y se identificaron 10 proteínas asociadas (Jorba *et al.*, 2008). Entre los factores identificados se encuentran proteínas nucleares implicadas en el metabolismo del RNA (hnRNPM, hnRNPH1, DDX5, DDX3, CoAA, Nxp2, SFPQ/PSF), proteínas citosólicas de transporte celular (β 5-tubulina) y de traducción (la subunidad S3 del ribosoma y la proteína *similar to zinc finger* 71). Las RNPs colocalizan a tiempos tempranos de infección con los factores hnRNPM, DDX5, Nxp2 y SFPQ/PSF y a tiempos más tardíos con DDX3. No obstante, mediante ensayos de silenciamiento génico se observó que los factores hnRNPM, DDX5 y DDX3 no son imprescindibles para el ciclo viral, mientras que la ausencia de los factores Nxp2 y SFPQ/PSF afecta notablemente a la producción de virus progenie.

En el laboratorio se ha profundizado en el estudio de la relevancia durante la infección de SFPQ/PSF, que constituye uno de los Objetivos de esta Tesis Doctoral, y Nxp2 (datos no publicados de Lorena Ver) pero la caracterización del resto de proteínas celulares que son capaces de interaccionar con la polimerasa viral nos ayudaría a revelar probablemente nuevas funciones tanto de la polimerasa viral como de los factores celulares.

2. Rastreo de compuestos químicos con actividad antiviral: una estrategia funcional

La estrategia anterior nos permite buscar vías celulares importantes para la infección por el virus de la gripe mediante la caracterización de los factores asociados a la polimerasa viral. Es muy probable que muchas de las proteínas identificadas usando este abordaje sólo tengan un papel adaptador, lo que explicaría que su ausencia no afecte al ciclo viral. Para identificar vías celulares que, desde un punto de vista más funcional sean importantes para las actividades llevadas a cabo por la polimerasa viral,

se recurrió a un rastreo de compuestos químicos en un sistema de replicón de RNPsGFP. Si alguno de los compuestos inhibiera específicamente la actividad autofluorescente de GFP podría ser debido a que estaba afectando a la replicación de las RNPs, la transcripción, el transporte de mRNAs o su traducción. La identificación de la diana celular afectada tras la adición del compuesto nos permitiría saber qué vía celular es importante para la replicación eficaz del virus. Una de las aportaciones más novedosas de este rastreo es que se utilizaron compuestos químicos que ya se han usado en ensayos clínicos en humanos y por tanto tienen un perfil toxicológico conocido. Por este motivo si alguno de los compuestos presentara actividad frente al virus de la gripe tanto *in vitro* como *in vivo*, la fase I del desarrollo clínico, que se centra en determinar un rango seguro de dosificación en humanos, estaría superada. Este hecho supondría una gran ventaja para incorporar este compuesto al mercado farmacéutico ya que más del 70 % de los compuestos que han sido aprobados en ensayos pre-clínicos no superan la fase I de los ensayos clínicos (Ledford, 2011). Se seleccionaron los compuestos candidatos de acuerdo con los siguientes criterios: (i) que inhiban la autofluorescencia de GFP cuando se expresa en el contexto de las RNPs, (ii) pero no cuando se expresa bajo un promotor de RNAPII y (iii) que reduzcan significativamente la producción de distintas cepas del virus de la gripe en líneas celulares con distintos orígenes (humano, perro y mono). Tras la realización de este rastreo se obtuvieron dos compuestos que superaron con éxito los cuellos de botella establecidos: la Ribavirina y el antiasmático *Montelukast sodium*. La Ribavirina es un nucleósido sintético que inhibe el crecimiento de virus tanto DNA como RNA, entre ellos el virus de la gripe (Sidwell *et al.*, 2007). El hecho de que haya sido seleccionado como candidato durante todo el proceso confiere robustez al método de rastreo diseñado. Del principio activo *Montelukast sodium*

no se habían descrito hasta la fecha propiedades antivirales, aunque en ocasiones aisladas se había suministrado este fármaco a los pacientes con gripe para aliviar los síntomas asociados a la enfermedad que son parecidos a los de la rinitis alérgica. La identificación de la diana antiviral del compuesto *Montelukast sodium* podría revelar nuevas vías celulares importantes para el desarrollo del ciclo infectivo.

Identificación de la proteína SFPQ/PSF como nuevo factor asociado a la polimerasa viral que participa en la poliadenilación de mRNAs virales

1. SFPQ/PSF se requiere específicamente para la infección por el virus de la gripe

Una vez se identificó a SFPQ/PSF como una proteína asociada a la polimerasa viral (Jorba *et al.*, 2008) se verificó esta asociación mediante inmunoprecipitación. Aunque se han detectado complejos de polimerasa soluble en células infectadas (Detjen *et al.*, 1987) la mayor parte se encuentra formando parte de las RNPs, por lo que con el objetivo de saber si SFPQ se asociaba con las RNPs se realizó un ensayo de inmunoprecipitación en células infectadas y se observó una clara asociación de SFPQ/PSF con las RNPs virales a 4 horas post-infección cuando tienen lugar en el núcleo los procesos de transcripción y replicación. Ensayos de colocalización por microscopía de inmunofluorescencia confocal en células infectadas revelan un alto grado de asociación entre NP nuclear, que se encuentra formando RNPs mayoritariamente y SFPQ/PSF (**Figura R7**).

Para saber si esta asociación tenía relevancia funcional durante la infección, los abordajes experimentales que se han llevado a cabo en esta Tesis Doctoral se

han basado en tratar de disminuir la expresión de SFPQ/PSF mediante siRNAs y analizar los efectos en la infección usando diferentes aproximaciones experimentales. En infecciones a baja multiplicidad se observa una disminución en la eficiencia de infección de 2 a 3 logaritmos en células en las que se ha silenciado la expresión de SFPQ/PSF usando dos siRNAs independientes en comparación con las células control (**Figura R3**). La obtención de menor cantidad de virus se correlaciona con el grado de silenciamiento apoyando la noción de que el efecto es específico del silenciamiento de SFPQ/PSF. Sin embargo las diferencias en la producción de virus en ensayos de infección a alta multiplicidad son mucho menores (**Figura R4**), lo cual sugiere la necesidad de que se produzcan varios ciclos infectivos en células en las que la expresión de SFPQ/PSF está silenciada para amplificar el efecto. En este ensayo se produce un retraso en la producción viral en las primeras horas de infección en células en las que la expresión de SFPQ/PSF está silenciada lo que sugiere que SFPQ/PSF participa en una etapa temprana del ciclo infectivo.

La lista de factores celulares asociados a proteínas del virus de la gripe muestra una mayoría de moduladores positivos de la multiplicación viral pero ninguno de ellos tienen un efecto tan grande en la producción de virus como SFPQ/PSF. Estos datos unidos al hecho de que SFPQ/PSF es una proteína multifuncional que participa en varios pasos de la transcripción celular o del procesamiento del RNA post-transcripcional, hicieron que mostrásemos un gran interés por saber si las células en las que la expresión de SFPQ/PSF está silenciada tienen alterada su actividad metabólica y por consiguiente el título viral puede disminuir inespecíficamente. Existen varias evidencias que apoyan que la viabilidad de las células no se afecta cuando se silencia la expresión de SFPQ/PSF en las condiciones optimizadas en esta Tesis: i) no se aprecian cambios

significativos en la actividad metabólica de células silenciadas respecto a las control usando un ensayo que mide la actividad mitocondrial (datos no mostrados); ii) el patrón general de la síntesis de proteínas celulares no cambia cuando se silencia la expresión de SFPQ/PSF (Jorba, 2009); iii) hay procesos del ciclo infectivo que no se afectan con el silenciamiento de SFPQ/PSF, como la replicación del RNA viral y el *splicing* de mRNAs virales; d) la multiplicación de virus de otras familias como VSV y Ad5 no disminuye en células en las que la expresión de SFPQ/PSF está silenciada (**Figura R5**). Cabe destacar que el control con Ad5 es muy estricto porque es un virus que replica en el núcleo de la célula infectada, como gripe, y que es fuertemente dependiente de la maquinaria de transcripción y de *splicing* celular. Además, este resultado sugiere que SFPQ/PSF se requiere de forma específica para la multiplicación por el virus de la gripe.

Como se ha descrito en la Introducción, SFPQ/PSF forma un heterodímero estable con p54nrb/NonO y a este heterodímero se le han asignado múltiples funciones en distintos pasos de la transcripción celular. Para saber si la infección eficiente por el virus de la gripe requiere SFPQ/PSF o el heterodímero SFPQ/PSF-p54nrb/NonO, se infectaron células control y células que tenían la expresión de NonO/p54nrb silenciada a baja multiplicidad. No se apreciaron cambios en la multiplicación de gripe cuando la expresión de p54nrb/NonO estaba silenciada (**Figura R6**) por lo que es SFPQ/PSF por sí misma y no el heterodímero la proteína responsable del efecto en la producción viral. Las proteínas SFPQ/PSF y p54nrb/NonO tienen una alta homología de secuencia y presentan similitudes estructurales que podrían indicar cierto solapamiento funcional entre ellas. Con los resultados obtenidos podemos concluir que la función que desempeña SFPQ/PSF durante el ciclo viral no es compensada por p54nrb/NonO. Además sería muy interesante estudiar si la

región N-terminal de SFPQ/PSF es la responsable de la asociación con la polimerasa viral ya que es la región diferencial entre SFPQ/PSF y p54nrb/NonO.

Las proteínas SFPQ/PSF, p54nrb/NonO y Pscp1 son esenciales para la formación de los orgánulos nucleares *paraspeckles*. A día de hoy se sabe que el virus de la gripe es uno de los pocos virus RNA capaces de llevar a cabo su ciclo replicativo en el núcleo de la célula infectada. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, no se sabe con exactitud la localización nuclear de dichos procesos, aunque se piensa que está muy asociada a sitios de transcripción celular activa. El hecho de que el silenciamiento de p54nrb/NonO, que es esencial para la formación de los *paraspeckles*, no produzca una bajada significativa de título viral, hace pensar que los procesos de expresión génica viral no tienen lugar en estos orgánulos nucleares.

2. La proteína SFPQ/PSF parece esencial para llevar a cabo el ciclo infectivo de gripe

Para estudiar el fenotipo de la infección en células silenciadas, la localización de las RNPs fue estudiada por microscopía de inmunofluorescencia confocal usando NP como marcador de las RNPs (**Figura R7**). Este ensayo además de establecer una correlación lineal entre las señales fluorescentes de SFPQ/PSF y NP reveló que el silenciamiento de SFPQ/PSF no tiene lugar en el 100 % de las células. Así, los bajos niveles de producción de virus que se cuantifican en células transfectadas con los siRNAs específicos de SFPQ/PSF (**Figura R3**) podrían ser debidos a ese pequeño número de células que no han sido transfectadas con los siRNAs. Si esta hipótesis fuera cierta, SFPQ/PSF sería un factor esencial para la multiplicación por el virus de la gripe.

3. Un factor de *splicing* celular es parasitado para la transcripción viral

Estudios realizados en células silenciadas e infectadas con el virus de la gripe han mostrado cómo el silenciamiento de SFPQ/PSF reduce los niveles de transcripción primaria (**Figura R9A**) y transcripción secundaria (**Figura R10B**) del virus de la gripe mientras que los procesos de *splicing* no se ven alterados. Estos resultados sugieren que un factor al que mayoritariamente se le han asignado funciones de *splicing* de los pre-mRNAs celulares participa en la transcripción de los mRNAs virales. Éste no sería el primer ejemplo de un virus que secuestra proteínas que tienen una función determinada y cambian de función en el contexto de la infección. El caso del bacteriófago Qb muestra un clásico ejemplo. La RdRp del fago Qb necesita proteínas implicadas en traducción celular para llevar a cabo la síntesis del RNA viral como EF-Tu, EF-Ts y S1 (Blumenthal & Carmichael, 1979). En este ejemplo, el fago Qb emplea factores celulares implicados en una función celular específica para llevar a cabo una función bastante diferente. El caso de la utilización de SFPQ/PSF por parte del virus de la gripe es menos drástico ya que se sabe que los procesos de transcripción y *splicing* están muy acoplados en células eucariotas (Bentley, n.d.; Hirose *et al.*, 1999).

4. Participación de SFPQ/PSF en la poliadenilación del virus de la gripe

Los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral demuestran que SFPQ/PSF afecta al proceso de terminación de la transcripción viral (**Figura R13**) pero no a la iniciación (**Figura R12**) ni a la elongación de los mRNAs virales. La terminación transcripcional es un elemento clave en el control de la expresión génica pero hasta la fecha no se dispone de mucha información acerca del proceso de

poliadenilación de gripe. El virus de la gripe utiliza la maquinaria celular para llevar a cabo el *splicing* y la traducción de los mRNAs virales pero no ocurre lo mismo con la poliadenilación de sus mRNAs ya que la polimerasa viral dispone de su propio mecanismo de poliadenilación diametralmente distinto al celular. De hecho, la célula hospedadora no transcribe RNAs a partir de moldes RNAs ni por consiguiente codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA. Por tanto, los factores de poliadenilación celular pueden no ser útiles para la poliadenilación de los mRNAs gripales. Este hecho contrasta con la situación de virus cuyo genoma es DNA como adenovirus o papilomavirus utilizan la maquinaria celular para la poliadenilación de sus mRNAs.

El mecanismo de poliadenilación de otros virus cuyo genoma es RNA es distinto al celular, aunque no todos usan las mismas estrategias. Los miembros de las familias Arenavirus y Bunyavirus, más cercanos filogenéticamente a gripe y poseen un genoma RNA segmentado de polaridad negativa no incorporan colas de poli-A a los mRNAs virales. El mecanismo de poliadenilación de gripe es más parecido a virus cuyo genoma no es segmentado, como VSV y RSV. Estos virus poseen un tramo de uridinas (Barr *et al.*, 2002) que la polimerasa viral copia de forma reiterada para dar lugar a la cola de poli-A (Barr *et al.*, 1997, 2001; Hwang *et al.*, 1998). La señal de poliadenilación de gripe también consiste en un tramo de uridinas (Li & Palese, 1994) que es funcionalmente análoga a la de los virus VSV y RSV (Poon *et al.*, 1999).

La caracterización del papel de SFPQ/PSF en la transcripción de los mRNAs virales nos ha mostrado que la función que desempeña SFPQ/PSF durante la poliadenilación de mRNAs de gripe es independiente de la secuencia de la señal de poliadenilación. Un posible papel que podría desempeñar SFPQ/PSF

sería estabilizar el complejo de poliadenilación aumentando la procesividad de la polimerasa viral, aunque se requieren más estudios en este sentido para demostrarlo.

Montelukast sodium como potencial antigripal

Montelukast sodium es un antagonista del receptor de cisteinil leucotrienos, en concreto LTD₄, que se usa en el tratamiento contra el asma persistente. Los leucotrienos son derivados del ácido araquidónico que tras unirse a su receptor (CysLT1) causan edema pulmonar, contracción del músculo liso e inflamación. Por tanto la diana terapéutica de este compuesto se encuentra en las vías aéreas, lo que le hace un candidato a antigripal muy atractivo. Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral indican que concentraciones subtóxicas del compuesto *Montelukast sodium* afectan a la síntesis de proteínas virales y consecuentemente a la producción de virus progenie en células infectadas. Para poder esclarecer el mecanismo molecular de acción del compuesto durante el ciclo infectivo, se trató de identificar la diana antiviral del compuesto. Hay varias evidencias que sugieren que la diana del compuesto es celular y no viral: (i) la mayor parte de los compuestos incluidos en la quimioteca utilizada no actúan contra patógenos sino que sus dianas son celulares (anti-inflamatorios, ansiolíticos, anti-depresivos etc), (ii) el compuesto presenta una elevada toxicidad en cultivo celular por lo que probablemente esté afectando alguna vía celular esencial para la célula, (iii) la adición del compuesto en un ensayo de transcripción *in vitro* de las RNPs virales no tiene ningún efecto (**Figura R24**) y (iv) la síntesis de proteínas virales en células humanas se ve especialmente comprometida en presencia del compuesto (**Figura R20**) pero no en células de ratón (**Figura R23**). Este dato además sugiere

que la vía celular afectada por el compuesto no está conservada entre humano y ratón.

La comparación de los datos de secuenciación masiva de los RNAs en células infectadas en presencia y ausencia del compuesto revelan una serie de RNAs cuya expresión es diferencial en las dos condiciones (**Tabla R1**). Este análisis podría dar información sobre la diana antiviral del compuesto aunque es necesario un estudio individualizado más exhaustivo. Particularmente interesante es el caso de los RNAs de *idol* y U1 snRNA, cuya expresión se potencia al infectar las células por el virus de la gripe y sin embargo, su expresión se reduce al tratar las células infectadas con el compuesto (**Figura R25B**). Estudios de Huang y col, han demostrado que hay una inducción de la proteína IDO1 (Huang *et al.*, 2013) al infectar ratones con el virus de la gripe. La proteína IDO1 participa en el catabolismo del triptófano a quinurenina y otros catabolitos. Se ha demostrado que la depleción del triptófano atenúa la respuesta inmune a la infección (Fox JM1, Sage LK, Huang L, Barber J, Klonowski KD, Mellor AL, Tompkins SM, Tripp RA). Por tanto, la inducción de IDO1 en células infectadas conlleva una reducción de la respuesta inmune y por tanto una mayor mortalidad de los ratones infectados. Por el contrario, ratones que no expresan la proteína IDO1 presentan una respuesta inmune más robusta y menos morbilidad frente a la infección. Estudios muy recientes han demostrado que el uso de 1MT, un análogo sintético que bloquea la actividad de IDO1, durante la infección por gripe modifica la expresión de los PPRs e induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- β , IL-1 β , IL-6, y TNF- α (Julie M. Fox, Leo K. Sage, Spencer Poore, Scott Johnson, S. Mark Tompkins and Ralph A. Tripp1). De esta manera el tratamiento con 1MT aumenta la respuesta inmune temprana contra el virus de la gripe. Una posible hipótesis es que el inhibidor 1MT tenga un efecto similar a *Montelukast sodium*

cuando se añade a células infectadas.

La relación entre la proteína componente del spliceosoma U1 snRNA y la infección por el virus de la gripe no está descrita en la bibliografía aunque son múltiples los estudios que relacionan el virus de la gripe con la maquinaria de *splicing* celular. Un ejemplo bien detallado es la interacción de la proteína viral NS1 con U6 snRNA (Qiu *et al.*, 1995b). Esta interacción inhibe la unión de U6 snRNA con otros miembros de la misma familia como U2 y U4 snRNA, lo que contribuye al bloqueo del *splicing* de los pre-mRNAs celulares. El estudio experimental del *splicing* tanto viral como celular en presencia del compuesto podría revelar si esta vía es importante para el efecto antiviral del compuesto.

¿Pueden utilizarse las vías celulares importantes para la multiplicación viral como una nueva diana terapéutica?

La alta variabilidad de secuencia del virus le confiere una capacidad de reacción frente a los cambios de ambiente. Debido a esta elevada variabilidad, continuamente aparecen cepas resistentes a los antivirales disponibles, lo cual limita la eficacia del tratamiento. Según datos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, todas las cepas de gripe circulantes en España en la temporada 2012-2013 fueron resistentes a adamantanos y como se vino observando en temporadas previas hubo resistencia a inhibidores de neuraminidasas aunque ésta se mantuvo baja. Por este motivo cada vez resulta más atractiva la idea de usar factores celulares como dianas antivirales. La célula hospedadora participa activamente en la infección por el virus de la gripe, no sólo activando la respuesta inmune contra el virus y la inducción de patogénesis sino proporcionando factores importantes para la multiplicación viral. En teoría todas estas proteínas podrían ser dianas de antivirales. La inhibición

de un factor celular reduce mucho la aparición de virus resistentes, sin embargo tiene el inconveniente de que probablemente presente toxicidad en el organismo. Otra alternativa sería diseñar antivirales que inhiban la interacción entre proteínas virales y celulares, aunque con esta estrategia tampoco se puede descartar la aparición de virus resistentes. Un ejemplo de este caso sería el descrito por Twu y cols en el que se inhibe la interacción de NS1 con el factor celular CPSF (Twu *et al.*, 2006). La proteína NS1 interacciona con CPSF para inhibir el procesamiento 3' de los mRNAs celulares. En cultivos celulares la expresión del fragmento de la proteína CPSF responsable de la interacción con NS1 es capaz de reducir el crecimiento viral hasta 60 veces pero se han observado la aparición de virus resistentes. Con estos datos la mejor propuesta sería hacer terapias combinadas de antivirales con dianas virales y dianas celulares para contrarrestar a distintos niveles la progresión de la infección.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta Tesis se proponen las siguientes conclusiones:

1. La proteína celular SFPQ/PSF es un factor esencial para la multiplicación del virus de la gripe.
2. La proteína celular SFPQ/PSF se requiere para la poliadenilación eficiente de los mRNAs virales.
2. Mediante rastreo con un sistema de replicón viral recombinante se han identificado compuestos químicos que inhiben los pasos de replicación y expresión génica del virus de la gripe.
3. El medicamento usado para el tratamiento del asma *Montelukast sodium* bloquea preferentemente la síntesis de proteínas del virus de la gripe.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Akarsu, H., Burmeister, W. P., Petosa, C., Petit, I., Muller, C. W., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (2003).** Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *Embo J* **22**, 4646–4655.
- Alfonso, R., Lutz, T., Rodriguez, A., Chavez, J. P., Rodriguez, P., Gutierrez, S. & Nieto, A. (2011).** CHD6 chromatin remodeler is a negative modulator of influenza virus replication that relocates to inactive chromatin upon infection. *Cell Microbiol* **13**, 1894–1906.
- Alfonso, R., Rodriguez, A., Rodriguez, P., Lutz, T. & Nieto, A. (2013).** CHD6, a cellular repressor of influenza virus replication, is degraded in human alveolar epithelial cells and mice lungs during infection. *J Virol* **87**, 4534–4544.
- Ali, A., Avalos, R. T., Ponimaskin, E. & Nayak, D. P. (2000).** Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* **74**, 8709–8719.
- Amorim, M. J., Read, E. K., Dalton, R. M., Medcalf, L. & Digard, P. (2007).** Nuclear Export of Influenza A Virus mRNAs Requires Ongoing RNA Polymerase II Activity. *Traffic* **8**, 1–11.
- Anisimova, E., Ghendon, Y., Markushin, S. (1980).** Ultrastructural Changes in Cells Induced by Temperature-sensitive Mutants of Fowl Plague Virus at Permissive and Non-permissive Temperature 0.
- Aragón, T., De la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J. & Nieto, A. (2000).** Translation factor eIF4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cel Biol* **20**, 6259–6268.
- Area, E., Martín-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2004).** Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 308–313.
- Arranz, R., Coloma, R., Chichon, F. J., Conesa, J. J., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Ortín, J. & Martín-Benito, J. (2012).** The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* **338**, 1634–1637.
- Avalos, R. T., Yu, Z. & Nayak, D. P. (1997).** Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *Journal of virology* **71**, 2947–58.

B

- Bae, S. H., Cheong, H. K., Lee, J. H., Cheong, C., Kainosho, M. & Choi, B. S. (2001).** Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10602–10607.
- Baranovich, T., Wong, S.-S., Armstrong, J., Marjuki, H., Webby, R. J., Webster, R. G. & Govorkova, E. a. (2013).** T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *Journal of virology* **87**, 3741–51.
- Barr, J. N., Whelan, S. P. J. & Wertz, G. W. (1997).** cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation . cis-Acting Signals Involved in Termination of Vesicular Stomatitis Virus mRNA Synthesis Include the Conserved AUAC and the U7 Signal for Polyadenylation.
- Barr, J. N., Wertz, G. W., Barr, J. N. & Wertz, G. W. (2001).** Polymerase Slippage at Vesicular Stomatitis Virus Gene Junctions To Generate Poly (A) Is Regulated by the Implications for the Mechanism of Transcription Termination Polymerase Slippage at Vesicular Stomatitis Virus Gene Junctions To Generate Poly (A) Is Regulated by the Upstream 3J-AUAC-5J Tetranucleotide : Implications for the Mechanism of Transcription Termination.
- Barr, J. N., Whelan, S. P. J. & Wertz, G. W. (2002).** Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochimica et biophysica acta* **1577**, 337–53.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. (1994).** Structure of influenza virus RNP. I. Influenza

virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**, 3158–3165.

Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1984). Synthesis of the templates for influenza virion RNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4682–4686.

Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6282–6286.

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**, 289–300.

Bennett, M., Michaud, S., Kingston, J. & Reed, R. (1992). Protein components specifically associated with prespliceosome and spliceosome complexes. *Genes & Development* **6**, 1986–2000.

Bentley, D. (n.d.). Coupling RNA polymerase processing II transcription with pre-mRNA.

Biswas, S. K. & Nayak, D. P. (1996). Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**, 6716–6722.

Blaas, D., Patzelt, E. & Keuchler, E. (1982). Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl Acids Res* **10**, 4803–4812.

Blumenthal, T. & Carmichael, G. G. (1979). RNA replication: Function and structure of Q β -replicase. *Ann Rev Biochem* **48**, 525–548.

Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* **124**, 12–21.

Bouloy, M., Plotch, S. J. & Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 4886–4890.

Braam, J., Ulmanen, I. & Krug, R. M. (1983). Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**, 609–618.

Brass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., Van der Weyden, L. & other authors. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* **139**, 1243–1254.

Bright, R. a, Medina, M., Xu, X., Perez-Oronoz, G., Wallis, T. R., Davis, X. M., Povinelli, L., Cox, N. J. & Klimov, A. I. (2005). Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* **366**, 1175–81.

Bright, R. A., Shay, D. K., Shu, B., Cox, N. J. & Klimov, A. I. (2006). Viruses Isolated Early During the 2005-2006 Influenza Season in the United States **295**, 891–894.

Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**, 3263–3274.

Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N. & Nieto, A. (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol* **81**, 12427–12438.

C

Chan, A. Y., Vreede, F. T., Smith, M., Engelhardt, O. G. & Fodor, E. (2006). Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**, 210–217.

Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J. & other authors. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306–1312.

Chen, Z. & Krug, R. M. (2000). Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends in microbiology* **8**, 376–83.

Chen, Z., Li, Y. & Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO journal* **18**, 2273–83.

Chou, Y. Y., Heaton, N. S., Gao, Q., Palese, P., Singer, R. & Lionnet, T. (2013). Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule

- sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog* **9**, e1003358.
- Cianci, C., Tiley, L. & Krystal, M. (1995).** Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* **69**, 3995–3999.
- Colman, P. M., Varghese, J. N. & Laver, W. G. (1983).** Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**, 41–44.
- Coloma, R., Valpuesta, J. M., Arranz, R., Carrascosa, J. L., Ortin, J. & Martin-Benito, J. (2009).** The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**, e1000491.
- Compans, R. W., Content, J. & Duesberg, P. H. (1972).** Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **4**, 795–800.
- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2005).** An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**, 205–213.

D

- Debi P. Nayak, Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou, and S. & Barman. (2010).** NIH Public Access **143**, 147–161.
- Deng, T., Sharps, J., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (2005).** In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**, 8669–8674.
- Deng, T., Vreede, F. T. & Brownlee, G. G. (2006).** Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* **80**, 2337–2348.
- Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J. & Palese, P. (1980).** The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**, 315–328.
- Detjen, B. M., St Angelo, C., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1987).** The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**, 16–22.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. (2009).** The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**, 914–918.
- Digard, P., Blok, V. C. & Inglis, S. C. (1989).** Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**, 162–169.
- Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A. & Pope, B. (1999).** Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *Journal of virology* **73**, 2222–31.

E

- Elton, D., Simpson, H. M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J. & Digard, P. (2001).** Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**, 408–419.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X. K., Serrano, A., Fan, X., Del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A. W. & other authors. (2006).** Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* **5**, 635–651.
- Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P. W., Kobayashi, R., Blencowe, B. J. & Ingles, C. J. (2002).** Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna* **8**, 1102–1111.
- Enami, M. & Enami, K. (1996).** Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70**, 6653–6657.

Engelhardt, O. G., Smith, M. & Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **79**, 5812–5818.

F

Falcón, A. M., Fortes, P., Marión, R. M., Beloso, A. & Ortín, J. (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* **27**, 2241–2247.

Falcón, A. M., Marión, R. M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A. & Ortín, J. (2004). Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J Virol* **78**, 3880–3888.

Falcón, A. M., Fernandez-Sesma, A., Nakaya, Y., Moran, T. M., Ortín, J. & García-Sastre, A. (2005). Attenuation and immunogenicity in mice of temperature-sensitive influenza viruses expressing truncated NS1 proteins. *J Gen Virol* **86**, 2817–2821.

Fernandez-Sesma, A. (2007). The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect Disord Drug Targets* **7**, 336–343.

Fodor, E. & Smith, M. (2004). The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* **78**, 9144–9153.

Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P. & Brownlee, G. G. (2002). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* **76**, 8989–9001.

Fortes, P., Beloso, A. & Ortín, J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J* **13**, 704–712.

Fortes, P., Lamond, A. I. & Ortín, J. (1995). Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *The Journal of general virology* **76** (Pt 4), 1001–7.

Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D., Lina, B. & other authors. (2012a). Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine* **30**, 7359–67. Elsevier Ltd.

Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Isel, C., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D. & other authors. (2012b). A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic acids research* **40**, 2197–209.

Fox, A. H., Bond, C. S. & Lamond, A. I. (2005). P54nrb Forms a Heterodimer with PSP1 That Localizes to Paraspeckles in an RNA-dependent Manner □ **16**, 5304–5315.

Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005). Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**, 3766–3774.

Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2002–2007.

Furuta, Y., Takahashi, K., Kuno-maekawa, M., Sangawa, H., Uehara, S., Kozaki, K., Nomura, N., Egawa, H. & Shiraki, K. (2005). Mechanism of Action of T-705 against Influenza Virus **49**, 981–986.

Furuta, Y., Gowen, B. B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smees, D. F. & Barnard, D. L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral research* **100**, 446–54. Elsevier B.V.

G

Garaigorta, U. & Ortín, J. (2007). Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**, 4573–4582.

Garaigorta, U., Falcon, A. M. & Ortín, J. (2005). Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**, 15246–15257.

- Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. (1992).** Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**, 9383–9390.
- Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. (1993).** Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **268**, 22223–22226.
- Gastaminza, P., Perales, B., Falcón, A. M. & Ortín, J. (2003).** Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* **76**, 5098–5108.
- Gavazzi, C., Isel, C., Fournier, E., Moules, V., Cavalier, A., Thomas, D., Lina, B. & Marquet, R. (2013).** An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus. *Nucleic acids research* **41**, 1241–54.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. (1973).** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417–23.
- Gibbs, J. S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2003).** The Influenza A Virus PB1-F2 Protein Targets the Inner Mitochondrial Membrane via a Predicted Basic Amphipathic Helix That Disrupts Mitochondrial Function **77**, 7214–7224.
- Gómez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Pérez-Pastrana, E. & Portela, A. (1999).** Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *The Journal of general virology* **80** (Pt 7), 1635–45.
- González, S. & Ortín, J. (1999).** Characterization of the influenza virus PB1 protein binding to vRNA: Two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* **73**, 631–637.
- González, S., Zürcher, T. & Ortín, J. (1996).** Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein responsible for interaction with the PB2 and PA subunits: A model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res* **24**, 4456–4463.
- Goodman, A. G., Smith, J. A., Balachandran, S., Perwitasari, O., Proll, S. C., Thomas, M. J., Korth, M. J., Barber, G. N., Schiff, L. A. & Katze, M. G. (2007).** The cellular protein P58IPK regulates influenza virus mRNA translation and replication through a PKR-mediated mechanism. *J Virol* **81**, 2221–2230.
- Gozani, O., Patton, J. G. & Reed, R. (1994).** A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *Embo J* **13**, 3356–3367.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**, 59–74.
- Greco-Stewart, V. S., Thibault, C. S. & Pelchat, M. (2006).** Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA. *Virology in press*.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R. W. H., Ortín, J. & other authors. (2008).** The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature structural & molecular biology* **15**, 500–6.

H

- Hagen, M., Chung, T. D., Butcher, J. A. & Krystal, M. (1994).** Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol* **68**, 1509–1515.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J. & Jackson, D. (2008).** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**, 2359–2376.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C. A., Newton, M. A., Ahlquist, P. & Kawaoka, Y. (2008).** Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* **454**, 890–893.
- Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N. & other authors. (2001).** Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes to Cells* **6**, 87–97.

- Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B. & Pandey, V. N. (2006).** Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1006–1018.
- Hatada, E. & Fukuda, R. (1992).** Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* **73**, 3325–3329.
- Hatada, E., Saito, S., Okishio, N. & Fukuda, R. (1997).** Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* **78**, 1059–1063.
- Hay, A. J., Skehel, J. J. & McCauley, J. (1982).** Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* **116**, 517–522.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A. & other authors. (2008).** Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**, 1123–1126.
- Heggeness, M. H., Smith, P. R., Ulmanen, I., Krug, R. M. & Chopin, P. W. (1982).** Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology* **118**, 466–470.
- Helenius, A. (1992).** Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**, 577–578.
- Hirose, Y., Tacke, R. & Manley, J. L. (1999).** Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing polymerase II stimulates pre-mRNA splicing 1234–1239.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K. & Ishihama, A. (1988).** RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* **104**, 1021–1026.
- Honda, A., Mukaigawa, J., Yokoizawa, A., Kato, A., Ueda, S., Nagata, K., Krystal, M., Nayak, D. P. & Ishihama, A. (1990).** Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem Tokyo* **107**, 624–628.
- Honda, A., Okamoto, T. & Ishihama, A. (2007).** Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* **12**, 133–142.
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005).** Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* **3**, 591–600.
- Horne, R. W., Waterson, A. P., Wildy, P. & Farnham, A. E. (1960).** The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology* **11**, 79–98.
- Hoyle, L., Horne, R. W. & Waterson, A. P. (1961).** The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**, 448–59.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. & Palese, P. (1987).** Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8140–4.
- Huang, L., Li, L., Klonowski, K. D., Tompkins, S. M., Tripp, R. A. & Mellor, A. L. (2013).** Induction and Role of Indoleamine 2, 3 Dioxygenase in Mouse Models of Influenza A Virus Infection **8**.
- Huang, T. S., Palese, P. & Krystal, M. (1990).** Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**, 5669–5673.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortin, J. & Nieto, A. (2001).** PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**, 8597–8604.
- Hull, B. Y. R. N., Cherry, W. R. & Tritch, A. O. J. (1962).** GROWTH CHARACTERISTICS OF MONKEY KIDNEY CELL THEIR UTILITY IN VIRUS RESEARCH 903–919.
- Hwang, L. N., Englund, N., Pattnaik, A. K., Hwang, L. N. & Englund, N. (1998).** Polyadenylation of Vesicular Stomatitis Virus mRNA Dictates Efficient Transcription Termination at the Intercistronic Gene Junctions Polyadenylation of Vesicular Stomatitis Virus mRNA Dictates Efficient Transcription Termination at the Intercistronic Gene Junctions.

I

- Inglis, S. C. & Brown, C. M. (1981).** Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic acids research* **9**, 2727–40.

- Inglis, S. C., Carroll, A. R., Lamb, R. A. & Mahy, B. W. (1976).** Polypeptides specified by the influenza virus genome I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**, 489–503.
- Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M. & Almond, J. W. (1979).** The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 3790–4.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K. & Kawaoka, Y. (2006).** The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**, 5233–5240.

J

- Jackson, D. A., Caton, A. J., McCready, S. J. & Cook, P. R. (1982).** Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* **296**, 366–368.
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, A. & other authors. (2012).** An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* **337**, 199–204.
- Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., Gastaminza, P., Zamarreno, N., Albar, J. P. & Ortin, J. (2008).** Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**, 2077–2088.
- Jorba, N., Coloma, R. & Ortin, J. (2009).** Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**, e1000462.
- Jorba, N. (2009).** Tesis Doctoral.

K

- Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. (2004).** Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513–525.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K. P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L. A. & other authors. (2010).** Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**, 818–822.
- Kash, J. C., Cunningham, D. M., Smit, M. W., Park, Y., Fritz, D., Wilusz, J. & Katze, M. G. (2002).** Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J Virol* **76**, 10417–10426.
- Kato, A., Mizumoto, K. & Ishihama, A. (1985).** Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus. *Virus Res* **3**, 115–127.
- Katze, M. G. & Krug, R. M. (1990).** Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* **44**, 265–277.
- Katze, M. G., Lara, J. & Wambach, M. (1989).** Nontranslated cellular mRNAs are associated with the cytoskeletal framework in influenza virus or adenovirus infected cells. *Virology* **169**, 312–322.
- Kawaguchi, A. & Nagata, K. (2007).** De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J* **26**, 4566–4575.
- Kawakami, E., Watanabe, T., Fujii, K., Goto, H., Watanabe, S., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2011).** Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J Virol Methods* **173**, 1–6.
- Kingsbury, D. W., Jones, I. M. & Murti, K. G. (1987).** Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. *Virology* **156**, 396–403.
- Klump, K., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (1997).** Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO journal* **16**, 1248–57.
- Klump, K., Ford, M. J. & Ruigrok, R. W. (1998).** Variation in ATP requirement during influenza virus transcription. *J Gen Virol* **79**, 1033–1045.

- Kobayashi, M., Toyoda, T. & Ishihama, A. (1996).** Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol* **141**, 525–539.
- Konig, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H. H., Bhattacharyya, S., Alamares, J. G., Tscherne, D. M., Ortigoza, M. B. & other authors. (2009).** Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**, 813–817.
- Krug, R. M., Broni, B. A. & Bouloy, M. (1979).** Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**, 329–34.
- Krug, R. M., St Angelo, C., Broni, B. & Shapiro, G. (1987).** Transcription and replication of influenza virion RNA in the nucleus of infected cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 353–358.

L

- De la Luna, S., Martín, J., Portela, A. & Ortín, J. (1993).** Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J Gen Virol* **74**, 535–539.
- De la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A. & Ortín, J. (1995).** Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**, 2427–2433.
- Lamb, R. A. & Choppin, P. W. (1979).** Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4908–12.
- Lamb, R. A. & Lai, C. J. (1984).** Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology* **135**, 139–147.
- Lamb, R. A. & Lai, C.-J. (1982).** Spliced and unspliced messenger RNAs synthesized from cloned influenza virus M DNA in an SV40 vector: Expression of the influenza virus membrane protein (M1). *Virology* **123**, 237–256.
- Lamb, R. A., Choppin, P. W., Chanock, R. M. & Lai, C. J. (1980).** Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1857–1861.
- Lamb, R. A., Lai, C. J. & Choppin, P. W. (1981).** Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 4170–4.
- Ledford, B. Y. H. (2011).** Clinical trials are crumbling under modern economic and scientific pressures. Nature looks at ways they might be saved. 7–9.
- Lee, M. K., Bae, S. H., Park, C. J., Cheong, H. K., Cheong, C. & Choi, B. S. (2003).** A single-nucleotide natural variation (U4 to C4) in an influenza A virus promoter exhibits a large structural change: implications for differential viral RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **31**, 1216–1223.
- Li, H. & Durbin, R. (2009).** Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1754–60.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R. (2009).** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 2078–9.
- Li, X. & Palese, P. (1994).** Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol* **68**, 1245–1249.
- Liang, Y., Hong, Y. & Parslow, T. G. (2005).** cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**, 10348–10355.
- Liang, Y., Huang, T., Ly, H. & Parslow, T. G. (2008).** Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**, 229–236.
- Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. (2014).** featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**, 923–30.
- Liu, C., Eichelberger, M. C., Compans, R. W. & Air, G. M. (1995).** Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* **69**, 1099–1106.

- López-Turiso, J. A., Martinez, C., Tanaka, T. & Ortin, J. (1990).** The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* **16**, 325–337.
- De Lucas, S., Peredo, J., Marion, R. M., Sanchez, C. & Ortin, J. (2010).** Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication. *J Virol* **84**, 7603–7612.
- Luo, G. X., Luytjes, W., Enami, M. & Palese, P. (1991).** The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *Journal of virology* **65**, 2861–7.
- Lutz, C. S., Cooke, C., Connor, J. P. O., Kobayashi, R., Alwine, J. C., Lutz, C. S., Cooke, C., Connor, J. P. O., Kobayashi, R. & Alwine, J. C. (1998).** The snRNP-free U1A (SF-A) complex (es): identification of the largest subunit as PSF , the polypyrimidine-tract binding protein-associated splicing factor The snRNP-free U1A (SF-A) complex (es): Identification of the largest subunit as PSF , the p.

M

- Madin, S. H. & Darby, N. B. (1958).** Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **98**, 574–6.
- Mahy, B. W. J. (1983).** Mutants of influenza virus. In *Genetics of influenza viruses*, pp. 192–253. Edited by P. Palese & D. W. Kingsbury. Wien: Springer Verlag.
- Marión, R. M., Zürcher, T., De la Luna, S. & Ortín, J. (1997a).** Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* **78**, 2447–2451.
- Marión, R. M., Aragón, T., Beloso, a, Nieto, a & Ortín, J. (1997b).** The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic acids research* **25**, 4271–7.
- Martin, K. & Helenius, A. (1991).** Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**, 117–130.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2001).** Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports* **2**, 313–317.
- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. (1981).** Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *The Journal of cell biology* **91**, 601–13.
- Mayer, D., Molawi, K., Martinez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., Grossmann, J., Garcia-Sastre, A. & Schwemmle, M. (2007).** Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. *J Proteome Res* **6**, 672–682.
- Mazur, I., Anhlán, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U. & Ludwig, S. (2008).** The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**, 1140–1152.
- McCown, M. F. & Pekosz, A. (2006).** Distinct domains of the influenza a virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**, 8178–8189.
- McKimm-Breschkin, J. L. (2013).** Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and other respiratory viruses* **7 Suppl 1**, 25–36.
- Meijer, A., Lackenby, A., Hungnes, O., Lina, B., Van der Werf, S., Schweiger, B., Opp, M., Paget, J., Van de Kassteele, J. & other authors. (2009).** Oseltamivir-Resistant Influenza Virus A (H1N1), Europe, 2007–08 Season. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 552–560.
- Meissner, M., Dechat, T., Gerner, C., Grimm, R., Foisner, R. & Saueremann, G. (2000).** Differential nuclear localization and nuclear matrix association of the splicing factors PSF and PTB. *Journal of cellular biochemistry* **76**, 559–66.

- Melton, A. A., Jackson, J., Wang, J. & Lynch, K. W. (2007).** Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNP L and PSF. *Mol Cell Biol* **27**, 6972–6984.
- Mena, I., Vivo, A., Perez, E. & Portela, A. (1996).** Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. *J Virol* **70**, 5016–5024.
- MERCK (2010).** Prospecto de SINGULAIR - montelukast sodium tablet, film coated. Dispensing Solutions Inc.
- Momose, F., Handa, H. & Nagata, K. (1996).** Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* **78**, 1103–1108.
- Momose, F., Basler, C. F., O'Neill, R. E., Iwamatsu, A., Palese, P. & Nagata, K. (2001).** Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**, 1899–1908.
- Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S., Morikawa, Y. & Nagata, K. (2002).** Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* **277**, 45306–45314.
- Momose, F., Sekimoto, T., Ohkura, T., Jo, S., Kawaguchi, A., Nagata, K. & Morikawa, Y. (2011).** Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome. *PLoS One* **6**, e21123.
- Moss, R. B., Hansen, C., Sanders, R. L., Hawley, S., Li, T. & Steigbigel, R. T. (2012).** MAJOR ARTICLE A Phase II Study of DAS181 , a Novel Host Directed Antiviral for the Treatment of Influenza Infection **206**.
- Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H. & Kawaoka, Y. (2006).** Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *Journal of virology* **80**, 2318–25.
- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. (2013).** Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of virology* **87**, 2455–62.
- Murphy, B.R and Webster, R. G. (1996).** In B. N. Fields, D. M. K. a. H. (ed), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Murti, K. G., Webster, R. G. & Jones, I. M. (1988).** Localization of RNA polymerases of influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology* **164**, 562–566.

N

- Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A. & Nagata, K. (2007a).** Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**, 1339–1349.
- Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., Kimura, A., Nakano, R., Matsukage, A. & Nagata, K. (2007b).** An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18235–18240.
- Nayak, D. P., Hui, E. K.-W. & Barman, S. (2004).** Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* **106**, 147–65.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R. M. (1998).** Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular cell* **1**, 991–1000.
- Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R. & other authors. (1999).** Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9345–9350.
- Neumann, G., Hughes, M. T. & Kawaoka, Y. (2000).** Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19**, 6751–6758.
- Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Kawaoka, Y. (2004).** Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 121–143.
- Neumann, G. & Kawaoka, Y. (2006).** Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza

pandemic. *Emerging infectious diseases* **12**, 881–6.

Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H. & Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490–2.

Noton, S. L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A. E., Elton, D. & Digard, P. (2007). Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**, 2280–2290.

O

O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. & Moroianu, J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *The Journal of biological chemistry* **270**, 22701–4.

O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**, 288–296.

Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J. R. H. & Park, S.-Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**, 1127–31.

Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**, 156–163.

Ortigoza, M. B., Dibben, O., Maamary, J., Martinez-Gil, L., Leyva-Grado, V. H., Abreu, P., Ayllon, J., Palese, P. & Shaw, M. L. (2012). A novel small molecule inhibitor of influenza A viruses that targets polymerase function and indirectly induces interferon. *PLoS pathogens* **8**, e1002668.

Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Goto, H., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2009). Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *Journal of virology* **83**, 3384–8.

P

Palese, P. & Schulman, J. L. (1976). Differences in RNA patterns of influenza A viruses. *Journal of virology* **17**, 876–84.

Palese, P. & Shaw, M. (2007). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology 5th edition*, pp. 1647–1689. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Park, Y. W. & Katze, M. G. (1995). Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *The Journal of biological chemistry* **270**, 28433–9.

Park, Y. W., Wilusz, J. & Katze, M. G. (1999). Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6694–9.

Parvin, J. D., Moscona, A., Pan, W. T., Leider, J. M. & Palese, P. (1986). Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* **59**, 377–383.

Passon, D. M., Lee, M., Rackham, O., Stanley, W. a, Sadowska, A., Filipovska, A., Fox, A. H. & Bond, C. S. (2012). Structure of the heterodimer of human NONO and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 4846–50.

Patton, J. G., Porro, E. B., Galceran, J., Tempst, P. & Nadal-Ginard, B. (1993). Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* **7**, 393–406.

Peng, R., Dye, B. T., Perez, I., Barnard, D. C., Thompson, A. B. & Patton, J. G. (2002). PSF and p54nrb

bind a conserved stem in U5 snRNA. *Rna* **8**, 1334–1347.

- Peng, R., Hawkins, I., Link, A. J. & Patton, J. G. (2006).** The splicing factor PSF is part of a large complex that assembles in the absence of pre-mRNA and contains all five snRNPs. *RNA Biol* **3**, 69–76.
- Perales, B. & Ortín, J. (1996).** Characterization of an in vitro system for influenza virus transcription and replication reconstituted from viral cloned genes. *Unpublished results*.
- Perales, B. & Ortín, J. (1997).** The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* **71**, 1381–1385.
- Perales, B., Sanz-Ezquerro, J. J., Gastaminza, P., Ortega, J., Fernández-Santarén, J., Ortín, J. & Nieto, A. (2000).** The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol* **74**, 1307–1312.
- Pérez, D. R. & Donis, R. O. (1995).** A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* **69**, 6932–6939.
- Perez-Gonzalez, A., Rodriguez, A., Huarte, M., Salanueva, I. J. & Nieto, A. (2006).** hCLE/CGI-99, a Human Protein that Interacts with the Influenza Virus Polymerase, Is a mRNA Transcription Modulator. *J Mol Biol* **362**, 887–900.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1992).** Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517–28.
- Pinto, L. H. & Lamb, R. a. (2007).** Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Molecular bioSystems* **3**, 18–23.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U. R. & Ludwig, S. (2001a).** Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature cell biology* **3**, 301–5.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U. R. & Ludwig, S. (2001b).** Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature cell biology* **3**, 301–5.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & Krug, R. M. (1981).** A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**, 847–858.
- Poole, E., Elton, D., Medcalf, L. & Digard, P. (2004).** Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**, 120–133.
- Poole, E. L., Medcalf, L., Elton, D. & Digard, P. (2007).** Evidence that the C-terminal PB2-binding region of the influenza A virus PB1 protein is a discrete alpha-helical domain. *FEBS Lett* **581**, 5300–5306.
- Poon, L. L., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (2000).** Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol* **74**, 418–427.
- Poon, L. L. M., Pritlove, D. C., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (1999).** Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**, 3473–3476.
- Portela, A., Zürcher, T., Nieto, A. & Ortín, J. (1999).** Replication of Orthomyxoviruses. *Adv Virus Res* **54**, 319–348.
- Pritlove, D. C., Poon, L. L., Fodor, E., Sharps, J. & Brownlee, G. G. (1998).** Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences. *J Virol* **72**, 1280–1286.

Q

- Qiu, Y. & Krug, R. M. (1994).** The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol* **68**, 2425–2432.
- Qiu, Y., Nemeroff, M. & Krug, R. M. (1995a).** The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA (New York, NY)* **1**, 304–16.
- Qiu, Y., Nemeroff, M. & Krug, R. M. (1995b).** The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna* **1**, 304–

R

- Read, E. K. C. & Digard, P. (2010).** Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *The Journal of general virology* **91**, 1290–301.
- Reed, R. & Cheng, H. (2005).** TREX, SR proteins and export of mRNA. *Current opinion in cell biology* **17**, 269–73.
- Resa-Infante, P., Recuero-Checa, M. A., Zamarreño, N., Llorca, O. & Ortín, J. (2010).** Structural and functional characterisation of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex. *J Virol* **84**, 10477–10487.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Seraphin, B. (1999).** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030–1032.
- Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T. & Fodor, E. (2009).** NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *The Journal of general virology* **90**, 1398–407.
- Robertson, J. S. (1979).** 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acid Research* **6**, 3745–3757.
- Robertson, J. S., Schubert, M. & Lazzarini, R. A. (1981a).** Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* **38**, 157–163.
- Robertson, J. S., Schubert, M. & Lazzarini, R. a. (1981b).** Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *Journal of virology* **38**, 157–63.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. (2011).** Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24–26.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. (2010).** edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140.
- Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A. & Nieto, A. (2007).** Influenza virus infection causes the specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol* **81**, 5315–5324.
- Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A., Hossain, M. J., Chen, L. M., Rolling, T., Perez-Brena, P., Donis, R., Kochs, G. & Nieto, A. (2009).** Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II. *J Virol* **83**, 11166–11174.
- Rosonina, E., Ip, J. Y., Calarco, J. A., Bakowski, M. A., Emili, A., McCracken, S., Tucker, P., Ingles, C. J. & Blencowe, B. J. (2005).** Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo. *Mol Cell Biol* **25**, 6734–6746.

S

- Sainz, B., Barretto, N. & Uprichard, S. L. (2009).** Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. *PloS one* **4**, e6561.
- Sambrook Fritsch, E.F. and Maniatis, T., J. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual*, Second Edi. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sansom, M. S., Kerr, I. D., Smith, G. R. & Son, H. S. (1997).** The influenza A virus M2 channel: a molecular modeling and simulation study. *Virology* **233**, 163–73.
- Sanz-Ezquerro, J. J., De la Luna, S., Ortín, J. & Nieto, A. (1995).** Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of co-expressed proteins. *J Virol* **69**, 2420–2426.
- Sanz-Ezquerro, J. J., Zürcher, T., De la Luna, S., Ortín, J. & Nieto, A. (1996).** The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol* **70**, 1905–1911.
- Sanz-Ezquerro, J. J., Fernández Santarén, J., Sierra, T., Aragón, T., Ortega, J., Ortín, J., Smith, G. L. & Nieto, A. (1998).** The PA influenza polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* **79**,

- Satterly, N., Tsai, P. L., Van Deursen, J., Nussenzveig, D. R., Wang, Y., Faria, P. A., Levay, A., Levy, D. E. & Fontoura, B. M. (2007).** Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1853–1858.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T. & Simons, K. (1999).** Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **274**, 2038–44.
- Scholtissek, C. & Rott, R. (1970).** Synthesis in vivo of influenza virus plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* **40**, 989–996.
- Schulman, J. L. & Palese, P. (1977).** Virulence Factors of Influenza A Viruses : WSN Virus Neuraminidase Required for Plaque Production in **24**, 170–176.
- Shapira, S. D., Gat-Viks, I., Shum, B. O. V., Dricot, A., De Grace, M. M., Wu, L., Gupta, P. B., Hao, T., Silver, S. J. & other authors. (2009).** A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* **139**, 1255–67.
- Shapiro, G. I., Gurney, T. J. & Krug, R. M. (1987).** Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**, 764–773.
- Shav-Tal, Y. & Zipori, D. (2002).** PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* **531**, 109–114.
- Shav-Tal, Y., Lee, B. C., Bar-Haim, S., Schori, H. & Zipori, D. (2001a).** Reorganization of nuclear factors during myeloid differentiation. *Journal of cellular biochemistry* **81**, 379–92.
- Shav-Tal, Y., Cohen, M., Lapter, S., Dye, B., Patton, J. G., Vandekerckhove, J. & Zipori, D. (2001b).** Nuclear relocalization of the pre-mRNA splicing factor PSF during apoptosis involves hyperphosphorylation, masking of antigenic epitopes, and changes in protein interactions. *Mol Biol Cell* **12**, 2328–2340.
- Shaw, M. W., Lamon, E. W. & Compans, R. W. (1982).** Immunologic studies on the influenza A virus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* **156**, 243–254.
- Shih, S. R., Nemeroff, M. E. & Krug, R. M. (1995).** The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6324–8.
- Shimizu, K., Handa, H., Nakada, S. & Nagata, K. (1994).** Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res* **22**, 5047–5053.
- Shin, Y. K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. & Zhou, Y. (2007).** Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation. *J Gen Virol* **88**, 942–950.
- Shope, R. E. (1931).** SWINE INFLUENZA : III. FILTRATION EXPERIMENTS AND ETIOLOGY. *The Journal of experimental medicine* **54**, 373–85.
- Sidwell, R. W., Bailey, K. W., Wong, M. H. & Huffman, J. H. (1995).** In vitro and in vivo sensitivity of a non-mouse-adapted influenza A (Beijing) virus infection to amantadine and ribavirin. *Chemotherapy* **41**, 455–461.
- Sidwell, R. W., Barnard, D. L., Day, C. W., Smee, D. F., Bailey, K. W., Wong, M. H., Morrey, J. D. & Furuta, Y. (2007).** Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 845–851.
- Sieczkarski, S. B. & Whittaker, G. R. (2002).** Dissecting virus entry via endocytosis. *The Journal of general virology* **83**, 1535–45.
- Simpson-Holley, M., Ellis, D., Fisher, D., Elton, D., McCauley, J. & Digard, P. (2002).** A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**, 212–25.
- Smith, G. L. & Hay, A. J. (1982).** Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**, 96–108.
- Smith, W., Andrewes, C. H. & Laidlaw, P. P. (1933).** A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **1**, 66–68.
- Suárez, P. & Ortín, J. (1994).** An estimation of the nucleotide substitution rate at defined positions in the influenza virus haemagglutinin gene. *J Gen Virol* **75**, 389–393.
- Sugiyama, K., Obayashi, E., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Tame, J. R., Nagata, K. & Park, S. Y. (2009).** Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *Embo J* **28**, 1803–1811.
- Sui, H. Y., Zhao, G. Y., Huang, J. D., Jin, D. Y., Yuen, K. Y. & Zheng, B. J. (2009).** Small interfering RNA

targeting m2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One* **4**, e5671.

T

- Takeda, M., Pekosz, A. & Shuck, K. (2002).** Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *Journal of ...* **76**, 1391–1399.
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P. J., Bougault, C. M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R. W. H., Daigle, N. & other authors. (2007).** Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nature structural & molecular biology* **14**, 229–33.
- Tharakaraman, K., Raman, R., Stebbins, N. W., Viswanathan, K., Sasisekharan, V. & Sasisekharan, R. (2013).** Antigenically intact hemagglutinin in circulating avian and swine influenza viruses and potential for H3N2 pandemic. *Scientific reports* **3**, 1822.
- Todaro, G. J. & Green, H. (1963).** Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines 299–313.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S. & other authors. (2013).** New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens* **9**, e1003657.
- Torreira, E., Schoehn, G., Fernandez, Y., Jorba, N., Ruigrok, R. W., Cusack, S., Ortín, J. & Llorca, O. (2007).** Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**, 3774–3783.
- Toyoda, T., Adyshev, D. M., Kobayashi, M., Iwata, A. & Ishihama, A. (1996).** Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol* **77**, 2149–2157.
- Twu, K. Y., Noah, D. L., Rao, P., Kuo, R. L. & Krug, R. M. (2006).** The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J Virol* **80**, 3957–3965.

U

- Ulmanen, I., Broni, B. A. & Krug, R. M. (1981).** The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 7355–7359.

V

- Villacé, P., Marión, R. M. & Ortín, J. (2004).** The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicate a role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**, 2411–2420.

W

- Wang, W., Cui, Z. Q., Han, H., Zhang, Z. P., Wei, H. P., Zhou, Y. F., Chen, Z. & Zhang, X. E. (2008).** Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* **36**,

4913–4928.

- Watanabe, K., Fuse, T., Asano, I., Tsukahara, F., Maru, Y., Nagata, K., Kitazato, K. & Kobayashi, N. (2006).** Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle. *FEBS Lett* **580**, 5785–5790.
- Watanabe, T., Watanabe, S. & Kawaoka, Y. (2010).** Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe* **7**, 427–439.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y. & Kawaoka, Y. (2003).** Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *Journal of virology* **77**, 10575–83.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988).** Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426–31.
- Wigler, M., Sweet, R., Sim, G. K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S. & Axel, R. (1979).** Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* **16**, 777–85.
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. & Digard, P. (2009).** A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**, 8021–8031.
- Wolff, T., O'Neill, R. E. & Palese, P. (1998).** NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* **72**, 7170–7180.
- Wu, W. W., Sun, Y. H. & Pante, N. (2007a).** Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virology* **4**, 49.
- Wu, W. W., Weaver, L. L. & Pante, N. (2007b).** Ultrastructural analysis of the nuclear localization sequences on influenza A ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* **374**, 910–916.

Y

- Yamanaka, K., Ishihama, A. & Nagata, K. (1990).** Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**, 11151–11155.
- Yanguez, E. & Nieto, A. (2011).** So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Res* **156**, 1–12.
- Yanguez, E., Rodriguez, P., Goodfellow, I. & Nieto, A. (2012).** Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. *Virology* **422**, 297–307.
- Yángüez, E. & Nieto, A. (2011).** So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus research* **156**, 1–12.
- Ye, Z. P., Pal, R., Fox, J. W. & Wagner, R. R. (1987).** Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *Journal of virology* **61**, 239–46.
- Young, R. J. & Content, J. (1971).** 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nature: New biology* **230**, 140–2.
- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X. & other authors. (2009).** Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**, 909–913.

Z

- Zebedee, S. L. & Lamb, R. A. (1988).** Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**, 2762–2772.
- Zhang, Z. & Carmichael, G. G. (2001).** The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex

- mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* **106**, 465–475.
- Zolotukhin, A. S., Michalowski, D., Bear, J., Smulevitch, S. V, Traish, A. M., Peng, R., Patton, J., Shatsky, I. N. & Felber, B. K. (2003).** PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol* **23**, 6618–6630.
- Zurcher, T., Marion, R. M. & Ortin, J. (2000).** Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J Virol* **74**, 8781–8784.
- Zürcher, T., De la Luna, S., Sanz-Ezquerro, J. J., Nieto, A. & Ortín, J. (1996).** Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: Studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol* **77**, 1745–1749.

ANEXO

